
Travail des Laboratoires de Chimie Biologique et Médicale
de la Faculté de Médecine de Montpellier
(Professeur P. CRISTOL)

**ANTICOAGULANTS
ET REPARTITION GLOBULO-PLASMATIQUE
DES ELEMENTS MINERAUX DU SANG**

THESE

Présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine de Montpellier
le 9 juin 1943

PAR

CHRISTIAN BÉNÉZECH

LICENCIÉ ES SCIENCES PHYSIQUES

CHARGÉ DES FONCTIONS D'ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

ET DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

CROIX DE GUERRE

né le 30 septembre 1917, à Castres (Tarn)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

*Examineurs
de la Thèse*

MM. CRISTOL, *prof., président.*

GIRAUD, *prof., doyen.*

LISBONNE, *professeur.*

MONNIER, *agréé.*

Assesseurs

IMPRIMERIE DE LA PRESSE
3, rue Jardin-Martel, 3
MONTPELLIER

1943

ANTICOAGULANTS
ET REPARTITION GLOBULO-PLASMATIQUE
DES ELEMENTS MINERAUX DU SANG

*Travail des Laboratoires de Chimie Biologique et Médicale
de la Faculté de Médecine de Montpellier
(Professeur P. CRISTOL)*

ANTICOAGULANTS ET REPARTITION GLOBULO-PLASMATIQUE DES ELEMENTS MINERAUX DU SANG

THESE

Présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine de Montpellier
le 9 juin 1943

PAR

CHRISTIAN BÉNÉZECH

LICENCIÉ ES SCIENCES PHYSIQUES

CHARGÉ DES FONCTIONS D'ASSISTANT DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

ET DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

CROIX DE GUERRE

né le 30 septembre 1917, à Castres (Tarn)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MEDECINE

*Examineurs
de la Thèse*

MM. CRISTOL, *prof., président.*

GIRAUD, *prof., doyen.*

LISBONNE, *professeur.*

MONNIER, *agrégé.*

Assesseurs

IMPRIMERIE DE LA PRESSE
3, rue Jardin-Martel, 3
MONTPELLIER

1943

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Professeurs

Chaires:

MM.

Anatomie	J. DELMAS.
Histologie	TURCHINI.
Physiologie	HEDON
Chimie biologique médicale et toxicologie	CRISTOL
Physique médicale	PECH
Anatomie pathologique et médecine expérimentale	BAUMEL
Microbiologie	LISBONNE
Pathologie et thérapeutique générales	PAGES.
Thérapeutique et matière médicale	JANBON.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	PUECH.
Hygiène	CARRIEU.
Médecine légale et médecine sociale	VIDAL.
Pathologie médicale et clinique propédeutique	BOULET.
Clinique médicale	L. RIMBAUD.
Clinique chirurgicale	GIRAUD, doyen.
	MASSABUAU, ass.
	LAPEYRE.
Clinique obstétricale	P. DELMAS.
Clinique des maladies mentales et nerveuses ..	EUZIERE, doyen. hon.
Clin. des malad. des enfants et hyg. du 1er âge ..	BOUDET.
Clinique de dermato-syphiligraphie	MARGAROT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ETIENNE.
Clinique des maladies des voies urinaires	JEANBRAU.
Clinique gynécologique	N...
Clinique ophtalmologique	DEJEAN.
Clinique d'oto-rhino-lar. et chir. maxillo-faciale	TERRACOL.

Charges de cours :

Anatomie	LAUX.
Histologie	GRANEL.
Radiologie	LAMARQUE.
Propédeutique chirurgicale	AIMES.

Professeurs honoraires

MM. TEDENAT, BERTIN-SANS, CABANNES,
GALAVIEILLE, VIRES, BOSC, VILLARD, GRYNFELTT, RICHE.

Chargés d'enseignements complémentaires

MM.

MM.

Chimie	MONNIER, agrégé.	Clinique de la	
Microbiologie . .	CARRERE, agrégé.	tuberculose . .	VIDAL, professeur.
Hist. nat. méd.	HARANT, agrégé.	Pathologie chir..	MOURGUE-
Pharmacologie. .	HARANT, agrégé.		MOLINES, agr.
Pathologie méd.	BOUCOMONT, agr.	— —	TRUC, agrégé.
— —	BERT, agrégé.	Chir. expérim. .	GUIBAL, agrégé.
Propédeut. méd.	P. RIMBAUD, agr.	Médecine opér..	ROUX, agrégé.
Clin. interne . .	PUECH, professeur.	Accouchements .	CADERAS
Clin. des mal.			DE KERLEAU, agr.
contagieuses . .	JANBON, profes.	Stomatologie . .	HOUPERT, docteur en
			médecine.

Agrégés en exercice

MM.

MM.

Médecine	P. RIMBAUD.	Chirurgie	MOURGUE-
—	BOUCOMONT.		MOLINES.
—	BERT.	—	GUIBAL.
—	LAFON, ch. d'agr.	—	ROUX.
Chimie	MONNIER.	Urologie	TRUC.
Bactériologie . .	CARRERE.	Accouchements .	CADERAS
Hist. nat. méd.	HARANT.		DE KERLEAU.



A MON PERE ET A MA MERE

*qui savent trop les sentiments que j'ai
pour eux pour que je les affaiblisse
par des mots.*

A MA GRAND'MERE

A MA TANTE

A MON FRERE

*que je confonds dans une même
affection.*

A TOUS CEUX QUE J'AIME

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CRISTOL

AVANT-PROPOS

Le travail que je présente aujourd'hui groupe les résultats de quatre années de recherches expérimentales. Il n'est qu'un modeste chapitre d'un très vaste problème: les équilibres de membrane en Biologie.

Son objet est très précis: expliquer pourquoi et comment agissent les anticoagulants sur la répartition globulo-plasmaticque des éléments minéraux du sang.

J'ai été parfois conduit à faire quelques digressions qui semblent s'éloigner du cadre strict de ce sujet, mais c'est précisément pour le situer dans le problème d'ensemble dont par ailleurs je poursuis l'étude.

Je montrerai plus tard, je l'espère, que ce cas particulier s'intègre logiquement dans une loi biologique générale.

*
**

Aux Professeurs de la Faculté de Médecine et de la Faculté des Sciences, j'adresse un souvenir reconnaissant pour la double culture médicale et scientifique que je leur dois.

Mais, à mon cher Maître, le Professeur Cristol, qui a bien voulu faire de moi, depuis de longues années, son collaborateur de tous les instants, m'aidant de sa haute compétence et m'encourageant de sa sympathie, je tiens à dire les sentiments affectueux et dévoués qui se sont gravés peu à peu dans mon cœur en une empreinte ineffaçable. Le sujet que j'étudie ici lui était particulièrement cher; je serai heureux si la confiance qu'il a placée en moi n'a pas été déçue.

Je remercie M. le Doyen Giraud, M. le Professeur Lisbonne et M. le Professeur agrégé Monnier de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

ANTICOAGULANTS ET REPARTITION GLOBULO-PLASMATIQUE . DES ELEMENTS MINERAUX DU SANG

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, la détermination du chlore sanguin a pris une importance justifiée par l'importance des renseignements que l'on est en droit d'en attendre, développement dû aux travaux de toute nature sur le chlorure de sodium, aliment ou médicament, sa physiopathologie et sur le perfectionnement constamment apporté aux méthodes de dosage.

Mais l'existence d'un tel électrolyte, particulièrement diffusible, dans le milieu hétérogène grossièrement biphasique que constitue le sang pose le problème de sa répartition, c'est-à-dire celui de la perméabilité des hématies. Nous savons, en effet, depuis les recherches d'HAMBURGER, en 1892, que les globules rouges sont perméables aux anions mais que cette perméabilité ne possède pas une valeur constante et reste soumise à des modifications en rapport avec les processus vitaux. C'est ainsi qu'il a pu être montré que des hématies placées dans une solution isotonique de nitrate de sodium ne varient pas de volume mais perdent du chlore par établissement d'un nouvel équilibre osmotiquement équivalent.

L'existence d'échanges constants entre les globules rouges et le liquide dans lequel ils sont en suspension, échanges soumis à des influences multiples, permet de penser que la répartition d'une substance entre éléments figurés et plasma n'obéira à des lois physico-chimiques relativement simples que de façon discontinue; autrement dit, le simple jeu des fonctions vitales fera de cette répartition une succession ininterrompue d'états d'équilibre fugaces. Mais la relative constance du milieu intérieur, conséquence des mécanismes dont l'ensemble constitue une synergie régulatrice, rend toutefois voisins, sinon identiques, les états créés par des phénomènes en transformation constante; il sera donc possible, en l'absence de graves perturbations de l'un de ces systèmes, d'envisager une répartition *moyenne* sensiblement constante dans des conditions physiologiques déterminées. Il sera, par suite, de toute nécessité, pour donner toute sa valeur à une investigation biochimique quelconque d'essayer, dans la mesure du possible, de maintenir hors des vaisseaux l'état dans lequel se trouvait le sang au moment de la ponction.

Depuis 1920, les travaux sur le métabolisme du chlore se sont multipliés aussi bien dans le domaine clinique qu'expérimental. Ces recherches ont, en particulier, montré l'intérêt du test constitué par le rapport chloré globulo-plasmatique non seulement dans l'étude de la physiologie des éléments minéraux du sang mais également dans ses rapports avec des métabolismes voisins, tels que le métabolisme protidique; au surplus, les résultats obtenus par la détermination du chlore sanguin, importants en eux-mêmes, éclairent singulièrement le rôle joué dans l'organisme par l'eau. Le métabolisme hydrominéral, intimement lié aux phénomènes bio-osmotiques de la perméabilité cellulaire devient ainsi un procédé d'étude relativement simple et particuliè-

rement précieux pour aborder cet important problème de biologie générale.

On conçoit aisément que l'introduction dans le sang d'un élément étranger minéral ou organique doive nécessairement entraîner des modifications non négligeables dans sa constitution globale, donc aussi dans la répartition globuloplasmatique des divers éléments, répartition qui en est la conséquence directe.

Or, il est un groupe de substances que l'on a l'habitude d'ajouter au sang dès sa sortie des vaisseaux pour empêcher sa coagulation; ces substances bouleversent l'état physico-chimique existant au moment de leur adjonction. Et si, dans certains cas, cette éventualité est rendue inévitable (par exemple, addition de fluorure de sodium pour la détermination de la glycémie, encore que le but principal ne soit pas d'empêcher la coagulation mais la glycolyse), il s'agit de savoir, lorsque le choix sera possible entre diverses substances, quelle est celle produisant les perturbations minima, c'est-à-dire maintenant le sang dans l'état le plus voisin de celui existant *in vivo*. Enfin, il y a lieu de se demander si l'on peut envisager la suppression pure et simple de tout anticoagulant et le recours éventuel à un procédé permettant d'approcher au maximum la réalité.

Pour répondre à ces différentes questions, nous avons entrepris une étude aussi systématique que possible des perturbations apportées à l'équilibre sanguin par l'addition d'anticoagulants divers (oxalates et bioxalates alcalins, fluorures et bifluorures alcalins, citrate trisodique, polyanéthol-disulfonate de sodium) dans des conditions variables d'état physique, de concentration et de temps de contact.

Il nous a, de plus, paru logique de généraliser cette étude en envisageant un certain nombre d'électrolytes dont nous aurons l'occasion de justifier le choix, la notion physico-

chimique d'équivalence osmotique permettant de mettre en lumière celle, biologique, de perméabilité sélective de la membrane globulaire.

Pour si intéressantes que soient les constatations faites, elles n'ont que la valeur de faits; il nous a semblé utile d'essayer de les interpréter en précisant la part respective des deux notions précédentes, nous efforçant ainsi d'expliquer pourquoi et comment l'addition d'un anticoagulant salin ou d'un électrolyte modifie l'équilibre initial du sang.

La détermination du chlore globulaire et plasmatique, l'appréciation des échanges d'eau, l'étude de la concentration moléculaire globale du sérum ont été adoptées comme moyens d'évaluation des modifications produites; ce choix étant justifié par le fait que les substances introduites influent électivement sur l'équilibre hydrominéral. Au surplus, le problème est assurément plus complexe et des recherches en cours, dont l'exposé fera l'objet d'un travail ultérieur, permettent vraisemblablement de le rattacher à des questions en apparence très éloignées, telles que les propriétés physico-chimiques des protéides sanguins.

L'objet de ce travail est donc, en somme, d'envisager les points suivants:

1. Dans quel sens et dans quelle mesure les sels minéraux, et en particulier les anticoagulants ordinairement employés influent-ils sur l'équilibre sanguin?

2. Quels sont les causes et le *mécanisme* de cette action.

3. Quel est le meilleur anticoagulant, c'est-à-dire quel est celui qui modifie le moins cet équilibre?

4. Le rapport chloré globulo-plasmatique peut-il être exactement déterminé en l'absence d'anticoagulants?

L'exposé de ces différents aspects de la question sera divisé de la façon suivante :

1. HISTORIQUE ET ÉTAT ACTUEL DU PROBLÈME (Chapitre I).

2. CONDITIONS GÉNÉRALES D'ÉTUDE (Chapitre II).

3. RECHERCHES PERSONNELLES SUR L'ACTION DES ANTI-COAGULANTS ET DE QUELQUES ÉLECTROLYTES (Chapitres III, IV, V, VI, VII et VIII).

CHAPITRE PREMIER

INFLUENCE DES ANTICOAGULANTS SUR LES ELEMENTS MINERAUX DU SANG ET EN PARTICULIER SUR LE RAPPORT CHLORE GLOBULO-PLASMATIQUE HISTORIQUE ET ETAT ACTUEL DU PROBLEME

I. — GÉNÉRALITÉS

Il est logique de chercher, dans la mesure du possible, à réaliser l'étude physique ou chimique du sang sur ce « *tissu* » conservé dans un état aussi voisin que possible de celui où il se trouve à l'intérieur des vaisseaux. Et si l'examen séparé des globules et du plasma est d'un grand intérêt, particulièrement pour les substances existant dans ces deux fractions du sang à des concentrations différentes, il faut avoir présente à l'esprit cette notion que toute étude portant sur les globules exige l'emploi d'un artifice ou d'un agent anticoagulant.

Le chlorure de sodium sur lequel BLUM, AMBARD et leurs collaborateurs ont attiré l'attention des biologistes et des cliniciens est le type des substances existant dans le sang en un déséquilibre apparent; l'étude de sa répartition, aujourd'hui courante, montre que l'accord est loin d'être fait, non seulement sur l'explication des variations pathologiques des

concentrations chlorées globulaires et plasmatiques, mais aussi sur la simple appréciation des limites de la chlorémie normale.

L'habitude de recueillir le sang sur un anticoagulant pour la détermination du rapport chloré globulo-plasmatique n'est d'ailleurs probablement pas étrangère aux divergences constatées ; il n'est donc pas inutile de se demander, à la lumière des travaux antérieurs, comment les expérimentateurs qui se sont occupés de la question, apprécient l'action des anticoagulants sur ce rapport, les modalités de cette action et, si possible, ses causes.

L'influence des anticoagulants sur les équilibres sanguins a déjà préoccupé pas mal de chercheurs et a donné lieu depuis 1926 à un certain nombre de travaux d'importance très diverse dont il convient de donner un bref aperçu.

En 1937, dans un mémoire présenté à la Société de Chimie Biologique, M. PAGET [1] écrivait : « *L'un des buts de ce mémoire est précisément d'attirer l'attention sur le rôle de l'anticoagulant dans la détermination du rapport chloré érythroplasmatic et d'apporter non pas des points de vue a priori dont je n'apprécie guère l'habituelle stérilité, mais des faits précis étayés sur une documentation numérique que je viens de recueillir personnellement au cours de ces six dernières semaines* ».

Il ne saurait être question de discuter l'inutilité des points de vue a priori, mais on peut faire quelques réserves sur l'importance et la valeur de la « *documentation numérique* » que l'on peut recueillir dans la littérature. Nous allons voir, en effet, que nos connaissances concernant l'influence des anticoagulants, la cause et le mécanisme de leur action sur le rapport chloré globulo-plasmatique ou, si l'on veut, érythro-plasmatique, sont trop peu

nombreuses et surtout trop fragmentaires pour autoriser une opinion nette. Ce ne peut être qu'après une étude approfondie non seulement de *l'action*, mais surtout du *mode d'action* des anticoagulants que nous comprendrons dans quelle mesure ils agissent, pourquoi ils agissent, comment on peut éviter leur emploi.

II. — HISTORIQUE DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Si les travaux antérieurs n'ont que très partiellement élucidé les questions que nous nous sommes posées, c'est que les résultats qu'ils fournissent ne tiennent en général pas compte de tous les facteurs ou du moins de tous ceux qui semblent les plus importants.

Une revue rapide des principales études les concernant va nous montrer à quel point l'imprécision est la qualité dominante de mémoires où il n'est d'ailleurs pas toujours traité de chlore globulaire et plasmatique, ce qui n'empêche pas leurs auteurs de formuler sur ce point comme sur les autres des opinions catégoriques. Au reste, nous ne citerons que les travaux que nous avons pu consulter nous-mêmes. Il est, en effet, inutile et toujours dangereux de rapporter des opinions d'auteurs dont on n'a pu lire les mémoires originaux. De plus, nous pensons que si nous avons commis quelque omission, cela ne change en rien le problème et ne peut modifier les conclusions que nous tirerons de ce bref aperçu historique.

I. Dès 1894, LIMBECK [2] a signalé que l'addition au sang de sels provoque un changement de volume globulaire ; à la suite de cette constatation, nombreux ont été les travaux qui ont porté sur les variations du volume des globules rouges dans des milieux de tonicité différente, ces modifications indiquant les changements survenus dans la

composition des globules rouges et du plasma, soit par échanges d'eau, soit par échanges d'autres corps.

Il s'agit là d'une étude schématique qui ne pouvait être et n'a été qu'un point de départ.

2. En 1922, H. WU [3] montrant l'importance de l'analyse séparée des globules et du plasma recommanda l'emploi de « l'oxalate » (sans préciser lequel) pour empêcher la coagulation du sang, mais n'indique nullement la dose à employer.

3. En 1926, EISENMAN [4] ébauche une étude des effets de l'oxalate de potassium sur les électrolytes du plasma et des globules ; toutefois, son étude principale porte sur les bicarbonates et ce n'est qu'accessoirement qu'elle s'occupe du chlore.

Ce travail contient une foule de renseignements intéressants et a malheureusement trop passé inaperçu. Sans entrer dans le détail, que nous reprendrons lorsque nous étudierons l'influence des oxalates, nous pouvons indiquer les principales conclusions directement intéressantes :

a) L'oxalate de potassium cause habituellement une contraction globulaire qui, sur des dosages différents, n'est pas rigoureusement proportionnelle à la concentration en oxalate.

b) La concentration des bicarbonates et des chlorures et leur répartition peuvent être légèrement mais distinctement altérées par l'oxalate ; on ne peut prévoir ni la grandeur ni le sens de ces changements sur un échantillon de sang donné.

c) La concentration des globules par l'oxalate est un phénomène que l'on doit prévoir si les globules sont imperméables aux ions K^+ et $C_2O_4^{--}$, à la fois ou inégalement perméables à chacun d'eux.

L'auteur n'a étudié que l'oxalate de potassium, les dosages ne sont pas systématiques et la durée de contact entre le sang et l'anticoagulant n'est pas prise en considération pour le chlore; nous aurons l'occasion de montrer l'importance de cet aspect du problème.

3. En 1929. H. THIERS [5] écrit: « *Le dosage (du chlore) devra porter sur le plasma et non sur le sérum. Le sang sera rendu incoagulable, mais par une substance qui n'en altère par l'équilibre minéral* ».

D'après l'auteur, le corps de choix est l'hirudine et, à son défaut, le citrate de sodium; l'oxalate doit être rejeté.

On pourrait souscrire à ces conclusions. mais à deux conditions:

a) Qu'en soient expliquées numériquement et expérimentalement les raisons;

b) Que soit indiqué à quel taux doivent être employés l'hirudine ou le citrate de sodium, précisions que l'on cherche en vain dans ce mémoire.

4. Ch.-O. GUILLAUMIN [6, 7], dans un mémoire, en 1930, à la Société de Chimie biologique, donne les conclusions suivantes:

a) Tous les anticoagulants salins, ajoutés à un échantillon de sang, même s'ils sont utilisés à dose active minima, apportent une modification dans la répartition initiale de l'eau et vraisemblablement de celle de nombreux éléments diffusibles entre le plasma et les globules, fait vérifié pour le chlore dans le présent travail;

b) Bien que le phénomène présente une intensité variable, il y a toujours passage de l'eau des globules vers le plasma, la contraction pouvant atteindre 20 p. 100 du volume initial avec les fluorures;

c) Au contraire de l'eau, l'ion chlore subit un transport vers les globules avec les citrates tribasiques, mais de sens inverse avec les oxalates et les fluorures; le rapport chloré se trouve erroné par excès avec les citrates, par défaut avec les autres;

d) Pour l'établissement exact du rapport Cl G/Cl P et lorsqu'on ne peut effectuer les mesures de suite, l'anticoagulant le plus parfait est du type antiferment, tel que l'hirudine; à défaut et si l'on ne peut utiliser qu'un anticoagulant salin, on choisira l'oxalate de sodium à un taux de 2 p. 1000, ou, si possible, inférieur;

e) Lorsqu'on recueille du sang sur une solution d'anticoagulant salin, le volume du liquide, après centrifugation, correspond non seulement à celui du plasma primitif, augmenté de la solution anticoagulante, mais encore à celui de l'eau globulaire exsudée qui apporte une dilution supplémentaire;

f) Les équilibres minéraux sanguins, mesurés par certains auteurs, sur des sangs largement additionnés d'anticoagulants salins, sont sans valeur.

Bornons-nous, pour l'instant, à faire remarquer que les trois premières conclusions sont analogues à celles de EISENMAN, avec quelques variantes concernant la répartition. D'autre part, tandis que cet auteur n'a étudié que l'oxalate de potassium, Ch.-O. GUILLAUMIN a employé l'oxalate et le fluorure de sodium, le citrate trisodique. L'un comme l'autre restent silencieux sur la concentration de l'anticoagulant et le temps de contact de celui-ci avec le sang.

5. Les conclusions de Ch.-O. GUILLAUMIN concernant l'influence du citrate trisodique sur le passage du chlore du

plasma vers les globules ont été combattues par S. RASZEJA et A. SLAWINSK [8]. D'après ces auteurs, cet anticoagulant ne provoquerait pas de déplacement de chlore. Une telle affirmation est d'ailleurs contestée par GUILLAUMIN qui se base sur les méthodes non classiques employées par les auteurs précédents ce qui, d'ailleurs, ne les empêche pas de maintenir leurs conclusions sans apporter de nouvelles données numériques.

6. NATTAN-LARRIER et TCHERNIAKOFISKY [9], publient, en 1935, quelques examens chimiques sur des sangs moranylés (1) ou liquoïdés. D'après eux, dans le sang rendu incoagulable par ces substances, « *le cholestérol, le glucose, le chlore, le calcium et le potassium ne subissent pas de variations dans les limites de sensibilité des méthodes employées habituellement* ».

Or, il est facile de constater qu'on ne trouve dans la note de ces auteurs ni dosages de chlore ni seulement indication des conditions expérimentales utilisées.

7. La même année BLITSTEIN [10] a publié un important mémoire sur l'influence de divers anticoagulants sur les dosages de certains éléments du sang. Cet auteur a étudié l'influence sur les dosages du chlore et d'autres éléments du sang de l'oxalate de potassium, du liquoïde, de l'héparine, de l'hirudine ainsi que celle du sulfate de zinc dont LUMIÈRE et COUTURIER [11] ont indiqué en 1926 l'action anticoagulante puissante. Il indique de nombreux dosages et a envisagé diverses concentrations des anticoagulants. Avec l'oxalate de potassium et le fluorure de so-

(1) Le moranyl est l'urée symétrique du métaaminobenzoyl-méta-amino-paraméthylbenzoyl-1-naphtylamino-4-6-8-trisulfonate de sodium.

dium, le rapport chloré globulo-plasmatique diminue légèrement, il augmente régulièrement avec le sulfate de zinc et devient généralement d'autant plus fort que la quantité d'anticoagulant est plus grande. L'héparine, l'hirudine et le liquoïde ont très peu d'influence sur ce rapport.

Malheureusement, cet auteur n'a pas étudié l'action du temps de contact, il est ainsi amené à attribuer les différents effets des anticoagulants à une altération de la membrane globulaire; nous aurons l'occasion de revenir sur cette opinion plus loin et de discuter les résultats de BLITSTEIN par rapport à ceux obtenus par nous dans le présent travail.

8. En 1937, HIGOUNET [12] a également étudié l'influence de l'oxalate de potassium, du fluorure de sodium, du citrate trisodique et du liquoïde sur la répartition des ions Cl entre le plasma et les hématies.

D'après cet auteur, *« les anticoagulants salins provoquent une diminution de volume globulaire d'autant plus forte que la quantité d'anticoagulant est plus importante : cette diminution s'accompagne du passage vers le plasma d'eau et d'ions Cl d'où diminution simultanée de la concentration et de la quantité totale de chlore des hématies... Dans le cas du citrate trisodique, la membrane des hématies se comporte comme imperméable aux ions chlore d'où augmentation du chlore globulaire et diminution du chlore plasmatique... L'influence de l'anétholdisulfonate de sodium polymérisé apparaît nulle sur le volume globulaire. »*

9. A la suite de toutes ces recherches, paraît en 1937, le mémoire de M. PAGET [1] posant la question de la détermination et de la valeur du rapport chloré érythroplasmatique. Après l'étude des trois anticoagulants principaux : oxalate de sodium, citrate trisodique, liquoïde, cet auteur

conclut : « Seul, le polyanétholdisulfonate de sodium ne semble pas modifier la perméabilité de la membrane globulaire et n'entraîne pas de migration d'eau chlorurée des globules vers le plasma. Par contre, l'oxalate et le citrate de sodium provoquent une contraction du volume globulaire avec dilution correspondante du plasma. L'oxalate et le citrate entraînent un déplacement de chlore toujours orienté vers le plasma ; la quantité de chlorure entraînée dans le cas du sang oxalaté étant plus élevée que celle qu'accuse l'action du citrate sur la perméabilité globulaire ».

10. La Société de Chimie Biologique demanda alors aux auteurs s'occupant de la question, de revoir l'ensemble des conclusions techniques sur lesquelles existe un accord. Voici celles de ces auteurs (CHABANIER, GUILLAUMIN, LAUDAT, LÉVY, PAGET et VAILLE [13]) : « On utilisera comme anticoagulant :

1°) L'hirudine ou l'héparine à des taux généralement voisins de 0,60 g par litre de sang, mais qui peuvent varier en plus ou en moins avec l'activité des échantillons.

2°) Le liquoïde (polyanétholdisulfonate de sodium) ROCHE à la concentration de 0,20 g par litre.

3°) A défaut, l'oxalate neutre de sodium ou de potassium à un taux ne dépassant pas 1 g par litre. »

Malgré ce, certains auteurs signataires du travail ci-dessus et notamment M. LÉVY [14] n'hésitent pas à employer ultérieurement l'oxalate de potassium dans la proportion de 2 g par litre et encore « la quantité de ce sel n'étant pas pesée pour chaque expérience, mais prélevée sur une petite cuiller, mesure de verre soigneusement étalonnée ».

11. D'autre part, CHORINE en 1939 [15, 16] étudie l'influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du

sang. Il a utilisé l'oxalate de potassium, le fluorure de sodium, le citrate trisodique, le liquoïde, l'hirudine et l'héparine. Ses recherches ont d'ailleurs porté surtout sur les protéïdes plasmatiques et lui ont permis d'observer une diminution de ceux-ci sous l'influence de divers anticoagulants ; (les sangs d'homme, de lapin, de mouton et de poule réagissent sensiblement de la même façon). Il note à la fin de son travail que les autres constituants du sang tels que le phosphore, le calcium, le magnésium, le glucose, les acides gras, les phospholipides, le cholestérol... accusent aussi dans le sang traité un abaissement de leur taux du même ordre de grandeur que celui des protéïdes. Les nombreux auteurs qui ont accordé leur attention à ce problème ne sont pas toujours absolument d'accord. Sans approfondir maintenant ces faits sur lesquels nous aurons l'occasion de revenir, signalons cependant parmi les travaux les plus importants, ceux de WU [3], FOLIN et BERGLUND [17], FOLIN et SVEDBERG [18], MARTENS [19], ceux de BARRENSCHEEN, DOLESCHALL et POPPER [20], TOLSTOI [21], BLITSTEIN [10], concernant le phosphore ; ceux de HAAG et JONES [22] sur le calcium ; de EVELETH [23], ABDERHALDEN [24], GREENBERG [25, 26], sur le magnésium ; ceux de FOLIN [27], BENEDICT et BEHRE [28, 29], OLMSTED [30], SOMOGYI [31, 32], POWER et SPANNUTH [33], à propos du glucose ; ceux de MAN et GUILDEA [34], SCHMIDT [35], sur les lipides ; de PAGET et PIERRART [36], SPERRY et SCHOENHEIMER [37], BUGHARD [38], CHABROL et PARROT [39], GARDNER, GAINSBOROUGH et MURRAY [40], Mme JUAN [41], sur le cholestérol, etc.

Le travail de CHORINE contient une foule de renseignements intéressants mais qui concernent surtout les protéi-

des, or il faut bien remarquer que le problème qui nous occupe est plus complexe que pour les protéides, substances non diffusibles, car, outre l'eau, plusieurs corps peuvent passer des globules rouges dans le plasma et vice-versa.

Enfin, en 1941, le même auteur [42] a plus spécialement envisagé l'influence des citrates sur la répartition du chlore entre les globules et le plasma. Ses chiffres montrent que les doses faibles de citrate trisodique (5 p. 1000) provoquent une augmentation du chlore plasmatique, le contraire se produisant aux doses fortes.

Telles sont brièvement résumées et aussi fidèlement rapportées que possible, les données essentielles des travaux qu'il nous a été possible d'étudier. Il semble, à première vue, après un examen superficiel que les divers auteurs émettent des conclusions analogues, sinon identiques. Mais si on approfondit les différents mémoires, on s'aperçoit d'abord que beaucoup sont inutilisables et que leurs conclusions reposent sur des expériences incomplètes dans lesquelles manquent nombre de données importantes : nature des témoins, dose exacte de l'anticoagulant, temps de contact avec le sang, vérifications des résultats trouvés par l'établissement des bilans, etc. Au surplus, dans les rares travaux où quelques-unes de ces données sont identiques, les résultats obtenus sont discordants.

Le tableau I peut donner une idée de quelques constatations faites par différents auteurs, groupées de façon à pouvoir être comparées. Les chiffres indiquent les pourcentages de variation, par rapport au sang témoin, concernant :

1) Le chlore globulaire (chlore par litre de globules : Cl G).

2) Le chlore plasmatique (chlore par litre de plasma : Cl P).

3) Le rapport $\frac{\text{chlore globulaire}}{\text{chlore plasmatique}} : R = \frac{\text{Cl G}}{\text{Cl P}}$

4) Le chlore contenu dans les globules d'un litre de sang : Cl GS.

5) Le chlore contenu dans le plasma d'un litre de sang : Cl PS.

Nous avons indiqué le mode de recueil du sang adopté comme témoin chaque fois que nous avons pu trouver ce renseignement.

Il est aisé de voir que l'accord est loin d'être fait ; il ne s'agit pas seulement d'écarts plus ou moins importants imputables à d'inévitables erreurs expérimentales, mais parfois de renversement complet du phénomène ; seul des cinq anticoagulants envisagés, le fluorure de sodium paraît avoir des effets comparables avec des doses et des auteurs différents.

Au surplus, les données sont la plupart du temps incomplètes et toujours très vagues : il n'est jamais question du temps de contact de l'anticoagulant avec le sang, pas plus que de l'état physique (dissous ou cristallisé) sous lequel l'un a été ajouté à l'autre ; la dose elle-même n'est pas prise en considération avec toute la précision souhaitable.. Les divergences d'opinion sont donc aisément concevables dans ces conditions, ainsi que le silence des divers auteurs sur le *mode d'action* des anticoagulants, mode d'action qu'il est pourtant indispensable d'essayer de comprendre pour résoudre les problèmes théoriques et pratiques que nous nous sommes posés.

TABLEAU I

Nature de l'anticoagulant	Dose en g p. 1000	Cl G	Cl P	R	Cl GS	Cl PS	Mode de recueil du témoin	Auteur
Oxalate neutre de potassium	1,6	— 3,4	— 0,3	— 3,2	— 9,1	+ 5,5	Défibriné	Blitstein
	1,7	— 9,9	0	— 9,9	— 18,0	+ 5,8	Défibriné	Eisenman
	1,7	— 4,3	— 1,9	— 2,5	— 11,8	+ 3,8	Défibriné	Eisenman
	1,9	+ 1,7	— 3,0	+ 4,9	— 3,7	+ 1,4	Défibriné	Eisenman
	2,0	— 3,8	— 0,8	— 3,1	— 8,3	+ 2,2	Défibriné	Eisenman
	2,0	— 2,5	— 0,6	— 0,9	— 10,0	+ 6,4	Défibriné	Blitstein
	2,0	— 7,4	— 1,3	— 6,1	— 18,2	— 3,8	Défibriné	Blitstein
	2,0	— 1,1	— 2,4	+ 1,4	— 8,5	+ 2,3	Défibriné	Blitstein
	2,2	— 2,1	+ 1,5	— 0,8	— 7,2	+ 1,7	Défibriné	Eisenman
	3,3	+ 11,3	— 1,7	+ 13,2	— 10,0	— 3,4	Défibriné	Eisenman
	4,0	— 8,2	+ 2,2	— 9,1	— 21,9	+ 5,8	Défibriné	Eisenman
	4,0	— 5,3	— 1,6	— 6,4	— 22,8	+ 13,7	Défibriné	Blitstein
	4,5	— 10,0	— 3,1	— 7,1	— 23,6	+ 6,8	Défibriné	Blitstein
	4,5	— 3,3	+ 2,6	— 0,9	— 17,9	+ 11,2	Défibriné	Eisenman
	5,0	— 6,4	— 3,2	— 3,2	— 20,0	— 11,6	Défibriné	Blitstein
	5,0	— 8,7	— 3,9	— 4,8	— 26,0	— 12,3	Défibriné	Blitstein
Oxalate neutre de sodium	2,0	— 10,4	— 1,1	— 9,6	— 19,7	+ 1,1	?	Guillaumin
	2,0	— 9,9	— 1,4	— 6,0	— 23,4	+ 15,6	Hirudiné	Paget
	2,0	— 7,0	0	— 7,0	— 12,3	+ 3,4	Hirudiné	Paget
Fluorure neutre de sodium	2,0	— 10,9	— 1,9	— 9,6	— 24,6	+ 16,4	?	Guillaumin
	3,0	— 6,9	— 3,2	— 3,7	— 28,8	+ 20,6	Défibriné	Blitstein
	3,0	— 8,2	— 4,5	— 3,9	— 27,7	+ 13,4	Défibriné	Blitstein
	3,0	— 3,1	— 3,8	— 2,1	— 21,3	+ 12,5	Défibriné	Blitstein
	3,0	— 9,8	— 3,5	— 6,5	— 24,5	+ 11,6	Défibriné	Blitstein
	6,0	— 11,9	— 5,5	— 6,8	— 38,4	+ 28,7	Défibriné	Blitstein
	6,0	— 7,6	— 7,0	— 0,7	— 33,2	+ 15,8	Défibriné	Blitstein
	6,0	— 11,5	— 5,4	— 6,3	— 37,4	+ 17,9	Défibriné	Blitstein
	6,0	— 18,3	— 5,4	— 13,7	— 40,0	+ 15,5	Défibriné	Blitstein
Citrate trisodique	3,0	+ 5,8	— 6,6	+ 13,2	— 1,1	+ 1,9	Défibriné	Blitstein
	3,0	+ 5,5	— 7,4	+ 14,0	— 4,1	+ 2,6	Défibriné	Blitstein
	3,0	— 30,6	+ 2,0	— 30,6	—	—	?	Chorine
	4,0	+ 8,6	— 8,1	+ 18,2	— 0,8	— 1,0	Défibriné	Blitstein
	4,0	+ 4,5	— 7,0	+ 12,3	— 10,9	+ 5,2	Défibriné	Blitstein
	5,0	— 16,4	— 1,1	— 14,5	—	—	?	Chorine
	5,0	— 27,2	+ 0,9	— 29,0	—	—	?	Chorine
	5,0	+ 2,0	— 9,1	+ 12,5	— 14,0	+ 8,5	Hirudiné	Paget
	6,0	+ 5,4	— 10,4	+ 17,7	— 15,4	+ 7,0	Défibriné	Blitstein
	6,0	+ 10,0	— 12,1	+ 24,8	— 7,0	+ 4,3	Défibriné	Blitstein
	10,0	+ 15,8	— 14,0	+ 34,9	— 5,4	+ 2,7	Défibriné	Blitstein
	10,0	+ 11,1	— 10,6	+ 24,2	— 12,4	+ 6,4	Défibriné	Blitstein
	10,0	— 17,9	— 4,05	— 13,0	—	—	?	Chorine
	10,0	— 17,4	— 3,0	— 16,4	—	—	?	Chorine
	20,0	+ 10,5	— 11,0	+ 2,5	—	—	?	Chorine
	20,0	— 25,0	— 6,0	— 2,0	—	—	?	Chorine
Liquoïde	0,2	0	0	— 0	+ 0,4	— 0,4	Hirudiné	Paget
	2,0	— 5,5	+ 2,2	— 7,5	— 5,6	+ 2,3	Défibriné	Blitstein
	2,0	— 0,3	— 8,7	+ 3,1	— 25,7	+ 12,2	Défibriné	Blitstein
	4,0	+ 1,6	— 8,1	+ 4,9	— 2,0	+ 9,3	Défibriné	Blitstein

COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS PAR DIFFÉRENTS AUTEURS

III. ETAT ACTUEL DU PROBLÈME

L'exposé qui précède montre qu'on ne saurait tirer de conclusions de travaux la plupart du temps fragmentaires et trop schématiques pour permettre d'aborder fructueusement le problème de la perméabilité globulaire.

Faute de données précises le concernant et concernant en particulier celui de la détermination du rapport chloré globulo-plasmaticque qui lui est intimement lié, la plupart des auteurs en arrivent à conseiller ce que PAGET [1] appelle un pis-aller, c'est-à-dire l'anticoagulant intervenant le moins dans les échanges ioniques à travers la paroi globulaire, à savoir l'oxalate de potassium à la dose de 1 g par litre de sang.

Les anticoagulants du type anti ferment jouissent d'une faveur sans doute méritée, mais que ceux-là mêmes qui les préconisent négligent de légitimer. Nous ne les avons pas étudiés au cours de ce travail, d'une part à cause de leur prix de revient excessif, d'autre part parce qu'il est pratiquement impossible de s'en procurer actuellement.

Enfin, le polyanétholdisulfonate de sodium (liquoïde), est également envisagé avec sympathie en particulier par PAGET qui n'hésite pas à le considérer comme « *l'anticoagulant idéal* » et à affirmer que « *ses propriétés lui donnent définitivement droit de cité* ».

Nous nous permettrons de ne pas être aussi enthousiastes ; les multiples études comparatives que nous n'avons pas dédaigné de faire, nous autorisent effectivement à penser que son addition au sang provoque des modifications du rapport globulo-plasmaticque du chlore, c'est-à-dire de l'ensemble des équilibres sanguins.

Quoi qu'il en soit, rappelons que la conclusion finale posée par l'ensemble des auteurs français s'étant occupés de la question se ramène à ceci : les anticoagulants à employer électivement pour l'étude des éléments minéraux du sang, et en particulier du chlorure de sodium sont par ordre de valeur décroissante :

- a) l'hirudine et l'héparine à 0,60 g p. 1000 ;
- b) Le liquoïde à 0,20 g p. 1000.
- c) L'oxalate de potassium à 1 g p. 1000.

Ainsi donc le problème du recueil d'un échantillon sanguin en vue d'une détermination devant porter sur les globules et le plasma se présente actuellement de la façon suivante :

1. Il est nécessaire d'empêcher la coagulation car, dans la grande majorité des cas, la centrifugation immédiate sans addition d'anticoagulant ne peut être pratiquée.

2. Les anticoagulants antidiastasiques, les seuls qui pourraient être logiquement utilisés ne sont pas d'un emploi courant dans les laboratoires médiocrement ou même moyennement outillés.

3. Toutes les autres substances douées de propriétés anticoagulantes actuellement connues et employées exercent dans le sang une perturbation plus ou moins importante sur laquelle les auteurs qui en ont esquissé l'étude n'ont que peu de données faute de documentation sérieuse.

4. Les résultats d'examens faits soit sur les globules soit sur le plasma provenant du sang additionné de fortes doses d'anticoagulants salins doivent être accueillis avec la plus grande circonspection. C'est en effet la concentration moléculaire qui régit la répartition d'eau entre les globules et le plasma : si on l'augmente dans le plasma (par addition d'anticoagulants salins en poudre ou en solution hyperto-

nique), l'eau sort des globules et les constituants plasmatiques se trouvent dilués; si on la diminue, c'est le contraire qui se produit.

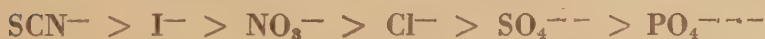
Donc, beaucoup de confusion, quelques rares faits précis, pas d'étude méthodique, tel est le bilan de l'état d'un problème dont l'importance n'a pas à être soulignée. Nous devons mettre en lumière ces constatations, ne serait-ce que pour justifier nos recherches et les placer dans un cadre où l'on rencontre surtout du verbiage et de l'imprécision.

IV. PERMÉABILITÉ DES HEMATIES

Il résulte de ce que nous venons de dire que le problème qui est en cause se rattache étroitement à celui de la perméabilité des hématies aux électrolytes. Nous pensons qu'il n'est pas inutile de donner sur cette importante question quelques indications générales et de résumer l'état actuel de nos connaissances dans un domaine où le nom d'HAMBURGER garde encore une place prépondérante.

C'est en effet, en 1883 que le physico-chimiste allemand a entrepris l'étude de l'hémolyse. Dès cette époque, il admit l'hémiperméabilité de la membrane globulaire, hypothèse qu'il devait abandonner en 1889 lorsque des recherches chimiques précises lui permirent de démontrer qu'il se produit des échanges entre les constituants globulaires et le milieu qui les baigne. Il démontra en 1892 la perméabilité pour les anions [43] et constata qu'elle n'a pas une valeur constante, mais est soumise à des modifications en rapport avec les processus vitaux. Enfin, en 1910, avec BUBANOVIC [44], il admit que, dans les conditions physiologiques, les hématies sont perméables aux cations.

Aux recherches surtout physiques d'HAMBURGER, doivent s'ajouter les innombrables travaux purement chimiques qui étudient la répartition globulo-plasmatique des ions. Outre ceux que nous avons déjà cités, et qui envisagent particulièrement l'effet des anticoagulants, mentionnons encore les recherches de MAIZELS [45], d'après lesquelles les hématies placées dans une solution de ClK absorbent le chlore non pas en fonction de la concentration extérieure en cet élément, mais seulement du pH d'où la conclusion que, si des globules rouges se trouvent dans un mélange de sels, la somme de tous les anions qui entrent en un temps donné, est égale à la quantité de Cl qui serait entré dans le même temps à partir d'une solution pure de même pH. Il en résulte que le rapport des concentrations de chaque anion à celle du chlore à l'intérieur des hématies peut être considérée comme une mesure du pouvoir de pénétration de cet anion. C'est ainsi que l'auteur a pu voir que les vitesses de pénétration des anions peuvent être classées dans l'ordre suivant :



ces vitesses étant toujours influencées par le pH. Cette influence du pH ressort également des recherches de CHORINE [15, 16] d'après lequel la perméabilité globulaire passe par un minimum pour un pH d'environ 8,3. En milieu acide, la perméabilité croît rapidement, en milieu alcalin, elle augmente plus faiblement. Quand on opère « in vitro », les résultats varient plus fortement avec le pH. De nombreux auteurs ont noté que l'acidité du milieu est favorable au passage des anions et que par contre, en milieu alcalin, la paroi globulaire devient perméable aux cations et les anions ne passent plus.

Quoi qu'il en soit, la perméabilité des hématies aux anions est une notion actuellement admise (MAIZELS [45, 46], HAMBURGER [47], VAN SLYKE et CULLEN [48], FREDERICA [49], HENDERSON [50], etc. Quant au cas particulier du chlore, si LÉVY et ses collaborateurs [51] n'arrivent pas à la mettre en évidence, celle-ci est nettement démontrée par les recherches de CRISTOL, FOURCADE et nous-même [52, 53] sur lesquelles nous aurons, d'ailleurs, l'occasion de revenir.

La perméabilité aux cations est beaucoup plus discutée: HAMBURGER et BUBANOVIC [44], ASHBY [54], PONDER et ROBINSON [55, 56], DAVSON [57, 58, 59], DAVSON et PONDER [60], l'admettent avec certaines réserves, mais la plupart des auteurs, et notamment KERR [61], HENDERSON [50], WAKEMAN, EISENMAN et PETERS [62], VAN SLYKE, WU et MC LEAN [63], FALTA et RICHTER-QUITTNER [64], MAIZELS [65], HALVERSON, MOHLER et BERGEIM [66], estiment que la paroi globulaire est pratiquement imperméable aux cations quand on se place dans des conditions assez voisines de l'état physiologique normal, c'est-à-dire quand les globules rouges ne sont pas altérés (pH, trop grande concentration saline, séparation des protéides du plasma).

Ce rapide aperçu permet notamment de constater qu'il y a en somme deux procédés très différents d'étude de la perméabilité des hématies :

D'une part, avec HAMBURGER [67, 68, 69], du moins dans ses premières recherches, les expérimentateurs essaient de mettre en évidence par des méthodes osmotiques le passage de sels pour des hématies placées dans des milieux artificiels hyper ou hypotoniques.

D'autre part, avec ABDERHALDEN [21], on cherche comment les sels (ou plutôt les ions, puisqu'il s'agit d'ana-

lyses chimiques) se répartissent entre globules rouges et plasma ou même entre globules rouges et sérum.

En fait, les deux méthodes n'analysent pas les mêmes phénomènes. La première, seule, est valable en ce qui concerne l'étude directe de la perméabilité et pourtant elle est passible de reproches notamment que les solutions artificielles altèrent certainement la couche limitante cellulaire et que les faits mis en évidence peuvent être eux aussi tout à fait artificiels et n'avoir rien de commun avec les phénomènes physiologiques se passant dans le sang circulant. La seconde paraît être exempte de la première objection, mais ses résultats sont douteux ; nous n'en voulons pour preuve que les conclusions souvent contradictoires auxquelles elle conduit.

De plus, il est très probable qu'au simple point de vue biologique, les analyses ainsi faites ne correspondent pas entièrement à ce qui existe réellement dans le sang circulant ; en effet, si nous travaillons comparativement sur hématies et sérum, le simple fait de la coagulation et du refroidissement du sang viendra certainement modifier la répartition ionique et d'autre part si, cherchant à expérimenter sur du sang non coagulé, on ajoute pour cela les corps chimiques nécessaires, on constate que ces substances empêchant la coagulation modifient et de façon différente la répartition globulo-plasmatique. Nous n'insistons pas sur ce fait qui, avec ses conséquences théoriques et pratiques et l'interprétation générale qu'on peut en donner, constitue l'objet de ce travail.

Les méthodes d'étude de la perméabilité sont donc passibles de certaines critiques, en particulier elles ne permettent que dans une certaine mesure d'effectuer des déterminations quantitatives et ne donnent pas la possibilité de faire une discrimination entre la pénétration à l'intérieur

de la cellule, c'est-à-dire dans le cytoplasma lui-même, et l'adsorption sur les constituants cellulaires extérieurs ; d'autre part, la répartition globulo-plasmaticque elle-même ne peut être un phénomène simple car, que les équilibres qui les régissent obéissent ou non aux lois de DONNAN (1), leur existence ne saurait être mise en doute, et la seule présence de colloïdes protéiques des deux côtés de la membrane apporte à l'étude de ce problème de réelles difficultés.

Il n'en reste pas moins, et malgré tout ce que nous venons de dire, que les méthodes indirectes ont permis des constatations de valeur générale et sont d'une réalisation sinon facile du moins toujours abordables avec des moyens expérimentaux même rudimentaires. Nous avons en ce qui nous concerne, tenté de combiner les deux moyens d'étude que nous venons de mentionner et pensons pouvoir, dans les pages qui suivent, justifier du double point de vue théorique et pratique, l'ensemble des méthodes que nous avons adoptées. Mais nous avons tenu à souligner que nous ne méconnaissions pas la valeur des critiques qui pourraient être formulées à leur sujet.

Bien plus, si, prenant des précautions spéciales, il est théoriquement possible de conserver à la même température « in vitro » le sang tel qu'il se présente dans le vaisseau « in vivo », nous sommes persuadés que du point de vue biologique, cela est impossible. En effet, il n'existe pas seulement des équilibres de répartition ionique entre hématies et plasma, mais aussi entre plasma et liquide extérieur aux vaisseaux. La simple suppression de ce dernier

(1) Certaines expériences nous inclinent à penser que ces équilibres de répartition sont soumis à la loi plus simple et plus générale de Graham, compte tenu de l'eau osmotiquement libre des hématies.

équilibre modifiera certainement le premier que nous étudions plus particulièrement.

Ainsi présenté, c'est-à-dire dans sa totalité, le problème n'est pas seulement complexe, il est théoriquement et pratiquement insoluble, du moins dans l'état actuel de nos moyens d'investigation. Nous ne pensons pas qu'une telle constatation devait nous amener à renoncer à aborder d'une manière ou d'une autre l'étude de la perméabilité des hématies ; aussi bien ce problème n'a-t-il pas été, au cours de ce travail, considéré en lui-même mais seulement dans la mesure où il nous a permis d'expliquer le rôle et le mode d'action des anticoagulants minéraux.

Il est sans doute prématuré d'énoncer dans ce domaine des règles trop absolues et des lois trop générales, aussi serons-nous prudent dans l'exposé de nos conclusions qui, d'ailleurs, n'ont pas la prétention d'éclaircir un phénomène à proprement parler biologique, mais un mécanisme physico-chimique dont la connaissance doit impliquer des conséquences pratiques, et peut suggérer quelques hypothèses, mais étant bien entendu que celles-ci, résultat d'expériences réalisées « *in vitro* », doivent être envisagées avec la plus grande circonspection.

CHAPITRE II

CONDITIONS GENERALES D'ETUDES

L'étude systématique de l'ensemble des éléments minéraux du sang ou seulement de quelques-uns d'entre eux constitue une série de recherches d'une abondance telle qu'on ne peut l'envisager dans un seul travail. De plus, une étude fragmentaire entraînerait nécessairement les erreurs que nous venons de souligner. Force nous a donc été d'avoir recours à une méthode indirecte d'appréciation des perturbations causées dans le sang par addition d'un sel minéral pourvu ou non de propriétés anticoagulantes.

Ceci revient à dire que nous avons décidé d'envisager l'étude d'un élément minéral particulièrement accessible à des investigations en série, dans le cas particulier, le chlorure de sodium. Nous pensons que les modifications constatées dans sa répartition doivent nous permettre de comprendre l'allure générale du phénomène.

Au surplus, nous avons fréquemment contrôlé le dosage du chlore par l'évaluation de la concentration moléculaire totale grâce à la détermination des abaissements du point de congélation des sérums. Dans toutes les expériences, les échanges d'eau ont été pris en considération, ce qui permet d'apprécier l'état osmotique de la membrane globulaire ;

les résultats ainsi obtenus ont été confrontés avec ceux fournis par la détermination du chlore.

I. JUSTIFICATION DU CHOIX DU CHLORE

Le choix que nous avons fait du chlorure de sodium, plus exactement de l'ion chlore, se justifie du double point de vue pratique et théorique.

I. Considérations d'ordre pratique :

La concentration du chlorure de sodium est environ de 5 g par litre aussi bien dans le sang humain que dans le sang de bœuf ou de mouton ; ce qui correspond à une concentration plasmatique de 6 g par litre et à une concentration globulaire de 3 g par litre avec par conséquent un rapport globulo-plasmatique de 0,5. Si l'on veut exprimer les résultats en chlore, il suffit de multiplier les chiffres précédents par la quantité : 0,607 ; le rapport est bien entendu conservé.

Supposons une variation en plus ou en moins de 10 p. 100 portant sur le chlorure de sodium plasmatique. Le dosage s'effectuant, comme nous le dirons plus loin, sur 1 cm³, la quantité de ClNa de la prise d'essai varie dans ces conditions de $\pm 0,6$ mg. Or 0,6 mg. de ClNa sont précipités par 1,74 mg de nitrate d'argent, c'est-à-dire environ 0,5 cm³ de solution 0,02 N de NO₃Ag. Par conséquent, une variation de 10 p. 100 dans la teneur en ClNa du plasma correspond dans le dosage final à une variation du volume de solution titrée nécessaire de 0,5 cm³ ; cette variation est de 0,25 cm³ seulement s'il s'agit des globules. D'autre part, les burettes dont nous nous servons permettent très aisément d'apprécier le vingtième de centimètre cube ; nous pouvons

done parfaitement nous rendre compte d'une variation de 1 p. 100 sur la concentration en ClNa du plasma et de 2 p. 100 sur celle des globules. Nous n'avons d'ailleurs en général considéré comme significatifs que des écarts ≥ 5 p. 100.

Les considérations précédentes montrent donc que la substance choisie pour cette étude doit non seulement se trouver dans le sang à une concentration suffisante, mais aussi se prêter à un dosage suffisamment précis et sensible.

Enfin nous avons, au cours de nos expériences, ajouté au sang des électrolytes divers, notamment du chlorure de sodium. Les quantités ajoutées étant souvent très importantes par rapport aux quantités existantes, il fallait tout de même que celles-ci ne soient pas négligeables. De tous les anions utilisés (fluorures, chlorures, nitrates, sulfates, acétates, oxalates, tartrates, citrate), seul le Cl^- remplissait cette condition. Quant aux cations, seul le sodium pourrait être envisagé si sa concentration dans les globules était suffisante (1).

La méthode adoptée pour le dosage du chlore est celle de VOLHARD CHARPENTIER appliquée par LAUDAT [70], aux milieux biologiques. Simple, précise et rapide, elle nécessite un matériel réduit, se prête à des dosages en série et permet d'obtenir, avec un peu d'habitude, une précision très largement suffisante pour notre étude. Enfin, elle est rigoureuse puisque basée sur des réactions bien établies de la chimie analytique.

(1) Quoique la presque totalité du chlore plasmatique soit associée au sodium et la plus grande partie du chlore globulaire au potassium, nous avons exprimé tous nos résultats en ClNa .

II. — CONSIDÉRATIONS D'ORDRE THÉORIQUE

L'adoption du chlorure de sodium comme électrolyte de référence, témoin des perturbations ioniques susceptibles de se produire dans le sang est donc justifiée par de simples raisons d'ordre pratique; elle l'est encore, ce qui est plus important, par des considérations théoriques.

Il est, en effet, établi que les électrolytes en solution subissent une dissociation plus ou moins importante mais pratiquement totale pour certains d'entre eux, dits électrolytes forts, du moins à un certain degré de dilution.

Considérons la réaction d'équilibre:



Si on appelle α le degré de dissociation, cela veut dire que 1 molécule de ClNa fournira:

α ions Cl^-

α ions Na^+

avec naturellement la condition: $\alpha \leq 1$.

On sait d'autre part que la conductibilité d'un électrolyte en solution est due aux ions positifs et négatifs. Or HITTORF a trouvé que ces ions se déplacent dans un même champ électrique avec des vitesses différentes, ce qui a permis à KOLRAUSCH de montrer que la conductibilité moléculaire pour une dilution infinie (c'est-à-dire très grande, pratiquement 0,001 N) peut être représentée par la somme de deux termes, l'un caractéristique des cations, l'autre

tre des anions, et qu'il a appelés *mobilités* représentées respectivement par les lettres U et V, d'où la relation de KOLRAUSCH :

$$\lambda_{\infty} = U + V \quad (1)$$

λ_{∞} s'appelle la conductibilité moléculaire limite. La conductibilité décroît d'ailleurs avec la concentration c :

$$\lambda_c = f(c).$$

L'équation (1) signifie que la mobilité d'un ion doit avoir la même valeur, que l'on parte pour la déterminer, de sels sodiques ou potassiques, par exemple. Si cette loi est vraie,

En désignant par

UNa et VCL les mobilités du sodium et du chlore à partir	du	ClNa
UK et WCL les mobilités du potassium et du chlore à partir	—	ClK
YNa et UNO ₃ les mobilités du sodium et de l'ion NO ₃ [—]	—	NO ₃ Na
YK et WNO ₃ les mobilités du potassium et du chlore à partir	—	NO ₃ K

les égalités ci-dessous :

$$(2) \quad \left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\infty} \text{ ClNa} = U_{\text{Na}} + V_{\text{CL}} \\ \lambda_{\infty} \text{ ClK} = U_{\text{K}} + W_{\text{CL}} \\ \lambda_{\infty} \text{ NO}_3\text{Na} = Y_{\text{Na}} + V_{\text{NO}_3} \\ \lambda_{\infty} \text{ NO}_3\text{K} = Y_{\text{K}} + W_{\text{NO}_3} \end{array} \right.$$

doivent entraîner les suivantes :

$$(3) \quad \left\{ \begin{array}{l} V_{\text{CL}} = W_{\text{cl}} \\ V_{\text{NO}_3} = W_{\text{NO}_3} \\ U_{\text{Na}} = Y_{\text{Na}} \\ U_{\text{K}} = Y_{\text{K}} \end{array} \right.$$

Or des mesures de conductibilité montrent que :

$$\left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\infty} \text{NO}_3\text{Na} = 104,6 \\ \lambda_{\infty} \text{ClK} = 129,1 \\ \lambda_{\infty} \text{ClNa} = 108,1 \\ \lambda_{\infty} \text{NO}_3\text{K} = 125,5 \end{array} \right.$$

d'où il résulte que :

$$\begin{aligned} \lambda_{\infty} \text{NO}_3\text{Na} - \lambda_{\infty} \text{NO}_3\text{K} &= 125,5 - 104,1 = 20,9 \\ \lambda_{\infty} \text{ClNa} - \lambda_{\infty} \text{ClK} &= 129,1 - 108,1 = 21 \end{aligned}$$

c'est-à-dire que :

$$\lambda_{\infty} \text{ClNa} - \lambda_{\infty} \text{ClK} = \lambda_{\infty} \text{NO}_3\text{Na} - \lambda_{\infty} \text{NO}_3\text{K} \quad (4)$$

Mais d'après le système (2), l'équation (4) s'écrit :

$$U_{\text{Na}} + V_{\text{Cl}} - W_{\text{Cl}} - U_{\text{K}} = Y_{\text{Na}} + V_{\text{NO}_3} - Y_{\text{K}} - W_{\text{NO}_3}$$

Si la relation de KOLRAUSCH est exacte, le système (3) doit être vérifié, c'est-à-dire que cette dernière équation doit s'écrire :

$$0 = 0$$

ce qui est vrai d'après l'équation (4) vérifiée expérimentalement et démontre la loi de KOLRAUSCH.

Par conséquent, et voici le point important pour nous, peu nous importe le cation auquel sera associé l'ion chlore puisqu'en vertu de la loi précédente, il possède des caractères physico-chimiques propres et réagira par conséquent comme particule électrique négative isolée sous l'action des influences diverses auxquelles nous le soumettrons.

Cela étant, la détermination du degré de dissociation peut se faire à partir de cette loi. Si, en effet, on a le droit

de représenter la conductibilité moléculaire limite par :

$$\lambda_{\infty} = U + V$$

comme nous venons de le montrer, lorsque la dilution n'est pas infinie et que par conséquent α est < 1 ; la dissociation n'étant pas totale, le transport du courant est réalisé exclusivement par les ions, par suite la conductibilité moléculaire à la concentration c sera représentée par :

$$\lambda_c = \alpha (U + V)$$

c'est-à-dire :

$$\alpha = \frac{\lambda_c}{U + V} = \frac{\lambda_c}{\lambda_{\infty}}$$

Le coefficient α est naturellement relatif à la concentration c comme le montre la formule précédente due à **ARRHENIUS**.

Cette équation va nous permettre de comparer la dissociation du chlorure de sodium à celle du chlorure de potassium, ce qui ne manque pas d'intérêt, puisque l'un de ces cations se trouve surtout dans le plasma et l'autre est prépondérant dans les globules.

En effet, les conductibilités moléculaires du ClNa et du ClK à différentes concentrations sont les suivantes :

Concentrations	N	0,1 N	0,01 N	$\frac{N}{\infty}$
de ClK	98,2	111,9	127,6	131,2
De ClNa	74,2	91,8	101,7	108,1

à la température de 18° .

Or, dans les globules, la concentration en chlore est telle qu'elle correspond à une solution 0,05 N en ClK . Le ta-

bleau ci-dessus permet, par intrapolation, de calculer la conductibilité correspondant à une telle concentration :

$$\lambda \text{ de ClK } 0,05 \text{ N} = 111,9 + \frac{127,6 - 111,9}{10} = 113,5$$

D'où le degré de dissociation du ClK globulaire :

$$\alpha_G = \frac{113,5}{131,2} = 0,865$$

Dans le plasma où le chlore est pratiquement en totalité sous forme de ClNa, il sert à une concentration correspondant sensiblement à une solution de ClNa 0,1 N d'où le degré de dissociation du ClNa plasmatique :

$$\alpha_P = \frac{91,8}{108,1} = 0,849$$

d'où il résulte que l'on peut sensiblement écrire :

$$\alpha_G = \alpha_P$$

c'est-à-dire que le degré de liberté de l'ion chlore est pratiquement le même des deux côtés de la membrane globulaire quel que soit le cation qui lui est associé.

Par les considérations précédentes, nous pensons avoir pleinement justifié le choix du chlorure de sodium comme électrolyte de référence dans nos expériences.

II. VALEUR ET SIGNIFICATION DU RAPPORT $\frac{\text{Cl G}}{\text{Cl P}}$

1. Au point de vue physico-chimique.

L'inégalité de répartition de certaines substances et notamment du chlorure de sodium dans les deux phases du

sang, a provoqué de nombreuses recherches et HENDERSON a exposé quelques-unes des raisons qui permettent de l'expliquer ; d'après lui, les deux principales sont :

1°) La présence de quantités différentes de protéides dans les deux phases.

2°) L'affinité inégale de l'hémoglobine et des protéides sériques pour les bases.

Quoi qu'il en soit, si on représente par $[A^-]_1$ et $[B^+]_1$ les concentrations moléculaires de deux ions acides et alcalins diffusibles dans les globules ; par $[A^-]_2$ et $[B^+]_2$ celles des mêmes ions dans le plasma, on sait que les considérations thermodynamiques de DONNAN [71] conduisent à l'équation :

$$[A^-]_1 \times [B^+]_1 = [A^-]_2 \times [B^+]_2$$

ou
$$\frac{[A^-]_1}{[A^-]_2} = \frac{[B^+]_2}{[B^+]_1} = R$$

On a dans le cas particulier du chlore : (1)

$$R = \frac{[Cl^-]_1}{[Cl^-]_2}$$

(1) Rappelons que le point de départ du calcul de Donnan est la formule de Nernst, exprimant le travail osmotique accompli lorsqu'une solution passe de façon réversible de la concentration c_1 à la concentration c_2 , dans laquelle:

$$T' = n.R.T.Loge \frac{c_1}{c_2}$$

n = nombre de molécules-gramme.

R = constante des gaz parfaits.

T = température absolue.

Or, cette formule n'est valable que si on admet l'assimilation des solutions idéales et même des solutions vraies aux gaz parfaits, ce qui revient à dire que le raisonnement de Donnan impli-

Une valeur normale de ce rapport qui constitue une *véritable constante physiologique spécifique* correspond à un état physico-chimique normal des globules et du milieu qui les baigne, c'est-à-dire qu'il permet en outre d'étudier le problème de l'eau comme l'admettent Mme RASZEJA et A. SLAWINSKI [72, 73, 74] pour lesquels le rapport chloré définit l'eau osmotiquement libre (2) des hématies, car la concentration du chlore dans le plasma et dans le cytoplasme du sang initial, est la même. Une telle méthode « *chlorimétrique* » serait d'après ces auteurs plus précise que la méthode osmométrique pour la détermination du volume d'eau libre. (2)

Les variations du rapport globulo-plasmaticque du chlore permettent encore d'étudier précisément les échanges chlorés sous l'influence des anticoagulants et par là, toujours d'après les mêmes auteurs, la variabilité de la membrane limitante qui serait la cause principale, sinon unique non seulement des différents rapports chlorés, mais aussi des différents volumes d'eau libre qu'on trouve dans les hématies des différents individus.

II. Au point de vue physio-pathologique.

De nombreux auteurs, et notamment CASTAIGNE [82, 83], CHABANIER [84], LAUDAT [85, 86], MACH [87], RA-

que l'application au sang de la formule de Van T'Hoff: $p.V = nRT$ (p étant la pression osmotique et V le volume des n mol.gr.).

A notre avis, ce fait suffit à faire accueillir avec réserve l'équilibre de Donnan appliqué au système globules plasma, ce qui, d'ailleurs, n'empêche nullement d'admettre l'existence d'un rapport globulo-plasmaticque pour un élément du sang, considéré comme une constante individuelle spécifique.

2. Sur la question de l'eau libre et de l'eau « liée », voir notamment les travaux de Sørensen (75), Adair et Robison (76), Nicloux (77, 78, 79), Cristol et ses collaborateurs (80, 81).

THERY [88, 89], RUDOLF [90, 91], PAGET et LANGERON [92], etc., se sont attachés à ce problème.

La signification générale de la chlorémie peut, d'après les constatations de ces derniers auteurs, être schématisée de la façon suivante :

1°) Une certaine chlorémie est indispensable au bon fonctionnement général et au bon fonctionnement rénal en particulier.

2°) Le chlore sanguin a un rôle dans le maintien de l'isotonie et un rôle antitoxique.

3°) Le taux du chlore sanguin est réglé par un certain nombre de conditions :

a) Un apport suffisant.

b) Des causes de déperdition extérieures.

c) Des causes de déperdition intérieure (neutralisation de toxiques endogènes ou exogènes, appel fait par les œdèmes réclamant le maintien de l'isotonie.

4°) Le rapport chloré G/P dépend de l'état d'acidose ou d'alcalose et peut servir de test pour apprécier ces états, leur cause (circulatoire ou rénale notamment) devant être ensuite établie par des moyens appropriés.

Il résulte de ces faits que la recherche de la chlorémie et du rapport chloré faite avec des techniques convenables présente un intérêt clinique évident, notamment indication et possibilité d'une rechloruration, test de défaillance rénale ou circulatoire.

Dans de telles investigations, la détermination du rapport chloré est au moins aussi importante que celle de la chlorémie totale, comme d'ailleurs celle des volumes globulaires et plasmatiques.

Nous ne saurions passer sous silence les travaux de l'école strasbourgeoise de BLUM [93, 94, 95] qui ont intro-

duit la notion d'azotémie par manque de sel, à partir de laquelle les travaux sur la chlorémie post-opératoire se sont multipliés.

Au surplus, toutes ces recherches sur les troubles du métabolisme du chlore ont été possibles :

1°) Grâce aux recherches poursuivies sur les techniques de dosage et leur perfectionnement.

2°) Grâce aux travaux qui ont défini l'état du chlore dans l'organisme, travaux que l'on peut résumer par cette conclusion de KAHANE [96] : « *Le problème de l'état du chlore dans les substances biologiques a été traité à différentes reprises par les physico-chimistes qui sont unanimes dans leurs conclusions : la totalité du chlore existe sous le même état dans les substances biologiques et dans une solution de chlorure de sodium... ; le chlore normal de l'organisme se comporte comme s'il était entièrement à l'état d'ion Cl^-* ».

Nous ne pensons pas qu'il soit utile d'insister davantage pour montrer l'importance du chlore en biologie.

II. VUE D'ENSEMBLE DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

La marche générale suivie dans nos expériences découle directement de tout ce qui vient d'être dit. Rappelons encore que nous nous sommes proposé d'éclaircir les points suivants :

I. Effets de divers anticoagulants et électrolytes sur la répartition globulo-plasmatique des éléments minéraux du sang et en particulier du chlorure de sodium.

II. Mécanisme de cette action.

Avant d'envisager quelques détails plus spécialement pratiques, indiquons rapidement le schéma d'une de nos expériences :

1°) Recueil du sang par défibrination simple, *pratiquement anaérobie* (1).

2°) Addition au sang défibriné de quantités variables d'anticoagulants ou d'électrolytes, soit en poudre, soit en solution iso ou hypertonique.

3°) Les substances ajoutées sont laissées en contact avec le sang à la température du laboratoire (pratiquement 15-18°) pendant des temps variables avec homogénéisation périodique.

4°) Séparation des globules et du plasma par centrifugation et décantation.

5°) Sur le sang défibriné initial (sang témoin) et sur chaque échantillon correspondant à une dose déterminée d'anticoagulant ou d'électrolyte et à un temps de contact déterminé, nous avons en général effectué :

- a) Dosage du chlore globulaire Cl G
- b) Dosage du chlore plasmatique Cl P
- c) Détermination du volume globulaire VG.
- d) Détermination du volume plasmatique VP.
- e) Détermination de l'abaissement cryoscopique du plasma ΔP .
- f) Détermination du pH du plasma pH P.

6°) Pour chaque anticoagulant ou électrolyte, nous avons établi des courbes d'abaissement du point de congélation en fonction des concentrations, ce qui nous a permis d'indiquer les équivalences osmotiques entre électrolytes différents et par suite, de comparer les effets de ceux-ci dans des conditions analogues de tonicité par rapport à la membrane globulaire.

(1) Nous nous expliquerons ultérieurement sur la signification de ce terme.

IV. REMARQUES GÉNÉRALES CONCERNANT LES TECHNIQUES ADOPTÉES

Nous groupons sous ce titre quelques indications d'ordre pratique concernant les diverses étapes que nous venons d'indiquer.

I. Recueil du sang.

Dans la plupart de nos expériences, nous avons utilisé du sang de mouton ; un certain nombre d'entre elles, notamment celles se rapportant au liquoïde, ont été réalisées avec du sang humain. Le sang de mouton présente le double avantage de pouvoir être très facilement obtenu en grande abondance, du moins à l'époque où a été effectuée la plus grande partie de ce travail, d'autre part, d'être plus résistant à l'hémolyse que le sang de bœuf. Nous n'avons pu nous procurer du sang de cheval avec une régularité suffisante. On peut nous objecter que nos conclusions ne seront valables que pour le sang de mouton ; à notre avis, cette objection ne peut être retenue, car nous avons pu montrer que les effets de l'addition « in vitro » de chlorure de sodium (électrolyte comparable à la plupart des anticoagulants) sont identiques pour le sang de mouton et pour le sang humain. De plus, CHORINE spécifie : « *Le sang humain et le sang de divers animaux (lapin, mouton, poule) répondent sensiblement de la même façon* ». Enfin, il nous était impossible de disposer d'une quantité suffisante de sang humain, 300 cm³ étant nécessaires pour la plupart de nos expériences.

Nous avons adopté pour le recueil du sang un procédé particulièrement simple : défibrination par billes de verre dans un flacon rigoureusement sec et bouché à l'émeri.

Nous reviendrons dans le prochain chapitre sur cette importante question.

II. Addition d'un électrolyte au sang.

C'est en général en poudre que les anticoagulants ou électrolytes ont été ajoutés au sang. La dose a toujours été exactement pesée à 0,1 mg près et non évaluée d'une façon plus ou moins fantaisiste. L'agitation au moyen d'une baguette de verre était immédiate jusqu'à diffusion homogène de l'électrolyte dans la masse sanguine, en général 10 cm³ exactement pipettés et recueillis dans un tube à centrifugation cylindro-conique d'une capacité totale de 20 cm³. Lorsque la substance a été introduite en solution, elle a toujours été exactement prélevée au moyen d'une pipette de précision à partir d'une solution titrée.

Après homogénéisation, les tubes dans lesquels étaient effectuées les manipulations précédentes, étaient bouchés au liège et abandonnés pendant un temps variable à la température du laboratoire.

III. Séparation des globules et du plasma (1)

Il s'agit là d'un temps particulièrement important de notre expérimentation. Nous avons pu vérifier à maintes reprises, qu'une centrifugation durant 30 minutes à la vitesse de 6.000 tours par minute assure une sédimentation globulaire très largement suffisante. Précisons d'ailleurs

(1) Quoique la plupart de nos expériences aient été faites avec du sang défibriné, nous appellerons indistinctement chlore plasmatique le résultat de dosages portant sur le plasma ou sur le sérum, ce terme étant d'un emploi classique.

que, comme l'indique PAGET [1], cette opération ne peut être remplacée par une centrifugation durant une heure à 3.000 tours, ce qui est aisément concevable puisque la force centrifuge F , cause du tassement globulaire, dépend pour une masse M de globules :

1°) De la distance R séparant la masse globulaire de l'axe de rotation de la centrifugeuse ;

2°) Du nombre de tours par seconde n ,
ce qui s'exprime par la relation :

$$(1) \quad F = K.n^2R$$

avec $K = 4\pi^2.M$

n est relié à la vitesse angulaire ω par la relation :

$$\omega = 2 \pi n$$

La formule (1) montre que la *vitesse* de centrifugation importe surtout et ne peut être remplacée par le facteur *temps* qui n'intervient pas dans l'expression de la force centrifuge.

Dans nos expériences :

$$n = 100$$

$$R = 12 \text{ cm.}$$

Il est donc nécessaire d'user d'une centrifugation rapide et, dit M. PAGET, « *les dix minutes de centrifugation à 2.000 tours préconisés par ARTHUS et qui ont guidé les essais de J. BOTTIN [97, 98], sont tout à fait insuffisants. Elles fournissent une purée globulaire à concentration chlorée exagérée, entraînant un rapport Cl G/Cl P très erroné par excès* ».

Nos conditions expérimentales nous assuraient dans ce domaine toutes garanties nécessaires et nous n'avons jamais observé de diminution de volume globulaire en prolongeant la centrifugation au-delà de 30 minutes.

La séparation des deux phases du sang étant ainsi assurée, le volume globulaire était exactement repéré au moyen d'une bande de papier gommé et le plasma soigneusement décanté. Nous avons toujours pratiqué l'asséchage du culot globulaire, c'est-à-dire l'élimination de sa surface des traces de plasma dont la présence risquait d'apporter une cause d'erreurs non négligeable dans le dosage du chlore globulaire surtout quand nous avons été amené, nous allons voir pourquoi dans quelques lignes, à effectuer celui-ci sur la totalité des globules.

IV. Détermination du chlore globulaire et plasmatique (1)

Nous avons effectué tous les dosages de chlore par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD en suivant la technique de minéralisation de LAUDAT [70]. Nous avons d'ailleurs tenu à étudier la méthode à froid, sans destruction, préconisée par DULIÈRE [99]. D'après cet auteur qui se base sur les observations de RAPPLEYE [100], la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD est directement applicable au plasma tel quel suffisamment dilué ; en fait, la nécessité d'une dilution assez importante impose la manipulation d'une grande quantité de liquide, d'où un virage délicat et parfois douteux.

La détermination du chlore globulaire se fait après déprotéinisation d'un hémolysat par l'acide nitrique pur sur le liquide clair obtenu par centrifugation.

L'une et l'autre de ces deux opérations nous paraissent justiciables des remarques suivantes :

(1) Voir, notamment, sur cette question. Lévy (104), Lévy et S. Mignon (105), Chabanier et ses collaborateurs (106), Raquet (107).

1°) Le plasma contient assez souvent de faibles quantités d'hémoglobine d'où parfois une coloration excessive et par suite, nécessité d'une dilution telle que le dosage perd de sa précision. Si par contre, comme l'auteur l'envisage, on cherche à obtenir un liquide clair par désalbumination nitrique suivie de centrifugation, la technique est ramenée au cas du dosage du chlore globulaire passible des deux critiques suivantes :

2°) Une certaine quantité de chlore reste nécessairement incluse dans le culot de centrifugation. Si, pour pallier à cet inconvénient, on pratique deux ou plusieurs lavages également suivis de centrifugation, la quantité de liquide obtenue est telle que le virage est encore insuffisamment net.

3°) La méthode de DULIÈRE nous semble, par ailleurs, ne pas échapper à une grave objection de principe : en effet, tandis que la technique de minéralisation de LAUDAT fait précéder l'addition d'acide nitrique de celle de nitrate d'argent, c'est l'inverse qui a lieu pour le dosage du chlore globulaire selon DULIÈRE. Et si le chlore, lorsqu'il est passé à l'état de chlorure d'argent, sel insoluble, est désionisé, donc inttaquable par l'acide nitrique, cette dernière action reste par contre possible lorsque cet acide est ajouté à un chlorure soluble d'où l'ion Cl^- peut être déplacé.

Il est vrai qu'à la déprotéinisation acide peut être substituée une désalbumination par des sels minéraux, notamment la défécation zinco-ferrocyanique selon PAGET [101, 102] ; nous nous en tiendrons sur ce point, à la conclusion qui résulte des travaux de WITHEHORN [103], selon lesquels ces méthodes apportent une cause de trouble inutile dans la titration argentique pour peu que les produits ne soient pas très purs.

4°) La technique de LAUDAT (1) est d'une exécution tellement simple qu'on s'explique mal l'opinion de DULIÈRE:

« Dans cette technique, dit cet auteur, on doit surveiller de près l'oxydation des globules pour maintenir en contact du liquide les particules agglomérées qui s'accrochent aux parois du vase et pour éviter que le liquide ne déborde. Cette dernière méthode, qui est d'ailleurs précise, développe des vapeurs irritantes et si l'on n'a pas beaucoup de temps à consacrer à la surveillance de l'oxydation, on porte à l'analyse un liquide qui garde une couleur jaunâtre qu'il n'est d'ailleurs pas toujours facile de faire disparaître entièrement par ébullition prolongée ».

Nous ne pouvons souscrire à cette affirmation. La longue pratique que nous avons de la méthode de LAUDAT nous permet d'affirmer que son exécution est facile, rapide, précise. Moyennant le mode opératoire sommairement indiqué ci-dessous, nous avons toujours eu des résultats satisfaisants.

1.) *Plasma*. — Dans un bécher en pyrex, on introduit :

- a) 1 cm³ de plasma.
- b) 10 cm³ de NO₃ Ag 0,02 N (2)
- c) 5 cm³ de NO₃H pur à 40° Bé.
- d) 2,5 cm³ de MnO₄K saturé.

Le tout est porté à douce ébullition jusqu'à décoloration totale, pratiquement obtenue en une vingtaine de minutes; si ce résultat n'était pas atteint, on ajoute une petite quan-

(1) Mme Raszeja (108) a publié, en 1932, une légère variante de la méthode de Laudat, consistant à éliminer le chlorure d'argent par centrifugation avant le titrage final, ce dont Guillaumin a montré l'inutilité.

(2) Ces quantités de nitrate d'argent sont relatives au sang normal et doivent naturellement être augmentées en conséquence lorsqu'il s'agit de sangs chlorurés.

tité de glucose, lactose ou d'alcool éthylique. Après refroidissement et repos à l'obscurité, le liquide surnageant le chlorure d'argent aggloméré est totalement incolore et parfaitement limpide, le dosage est alors très aisé.

2.) *Globules.* — Dans un bécher en pyrex sont introduits :

- a) 1 cm³ de culot globulaire ou un volume d'hémoly-sat équivalent.
- b) 10 cm³ de NO₃Ag 0,02 N (1)
- c) 10 cm³ de NO₃H à 40° Bé.
- d) 3 × 5 cm³ de MnO₄K saturé. (2)

Le mélange est ensuite porté à l'ébullition modérée jusqu'à obtention d'un liquide clair présentant une faible coloration jaune paille qui ne gêne nullement l'opération terminale du dosage, du moins avec un peu d'entraînement et moyennant les précautions ci-dessus indiquées, c'est-à-dire refroidissement et repos à l'obscurité.

Dans le cas des globules comme dans celui du plasma, le volume final ne doit pas excéder une vingtaine de centimètres cubes.

Nous avons tenu à justifier les observations concernant la technique de DULIÈRE, par quelques expériences comparatives rassemblées dans le tableau II.

Il en découle avec netteté que les résultats obtenus par cette méthode sont toujours entachés d'erreur par défaut, ce qui à notre avis, légitime la remarque n° 3 et par suite le rejet d'une technique dont l'adoption n'apportait pas à notre étude une simplification appréciable.

(1) Voir note (2) de la page précédente.

(2) La notation 3 × 5 cm³ signifie que le permanganate est ajouté en trois fois après chaque décoloration partielle, si les 15 cm³ sont insuffisants pour la minéralisation, la quantité nécessaire est ajoutée goutte à goutte.

TABLEAU II

	Méthode de Dulière	Méthode de Laudat	Ecart p. 100
Sang de mouton défibriné.	6,17	6,46	— 4
Sang de mouton défibriné.	5,98	6,26	— 4,4
Sang de mouton défibriné.	6,31	6,57	— 4
Sang de mouton défibriné.	6,25	6,32	— 1
Sang de mouton défibriné.	6,86	7,0	— 2
Sang+Cl Na à 30 p. 1000.	18,92	19,46	— 3
Sang+Cl Na à 25 p. 1000.	16,80	17,08	— 1,5
Sang+Cl Na à 20 p. 1000.	14,78	14,91	— 1
Sang+Cl Na à 15 p. 1000.	12,62	12,76	— 1
Sang+Cl Na à 10 p. 1000.	10,48	10,62	— 1,5
Sang humain défibriné ..	2,98	3,39	— 12
Sang de mouton défibriné.	4,15	4,48	— 7,4
Sang humain défibriné ..	3,45	3,67	— 6
Sang de mouton défibriné.	4,12	4,35	— 5
Sang de mouton défibriné.	3,51	3,75	— 4
Sang+Cl Na à 30 p. 1000.	7,84	7,98	— 2
Sang+Cl Na à 25 p. 1000.	7,32	7,49	— 2,3
Sang+Cl Na à 20 p. 1000.	6,1	6,35	— 4
Sang+Cl Na à 15 p. 1000.	5,75	5,90	— 2,6
Sang+Cl Na à 10 p. 1000.	5,10	5,22	— 2

ETUDE COMPARATIVE DE LA MÉTHODE DE LAUDAT
ET DE LA MÉTHODE DE DULIÈRE

Les résultats sont exprimés en g par litre de ClNa. Les dix premiers sont relatifs aux plasmas, les dix derniers aux globules.

La détermination du chlore plasmatique a donc toujours été effectuée sur 1 cm³.

Dans les globules, la prise d'essai a été suivant les cas de 1 cm³ exactement mesuré avec les précautions habituelles ou bien elle a porté sur une portion aliquote du culot globulaire préalablement hémolysé et ramené à un volume connu ; cette fraction correspondant en général à un volume de globules supérieur ou au moins égal à 1 cm³. Nous avons été contraint d'adopter cette manière de procéder,

surtout pour les échantillons dans lesquels nous avons ajouté une solution de chlorure de sodium à 25 ou 30 p. 100, par suite de la quasi impossibilité de pipetter la masse globulaire devenue extrêmement visqueuse à cause de la très importante perte d'eau due à l'hypertonie du milieu baignant les globules.

Il en résulte évidemment, surtout pour les volumes de 5 cm³ de sang, une cause d'erreur tenant à ce qu'il reste toujours, adhérente à la petite baguette de verre ayant servi à l'homogénéisation du sang total, une minime quantité de globules qui échappe au dosage ; cette erreur est insignifiante, nous nous en sommes rendu compte par l'expérience suivante :

L'agitateur retiré du mélange sang-chlorure de sodium à 297,75 p. 1000 est rincé à l'eau distillée dans un bécher en pyrex. Après élimination complète du mélange adhérent à l'agitateur, on ajoute 4 cm³ de NO₃Ag 0,02 N, 1 cm³ de MnO₄K saturé et 3 cm³ de NO₃H à 40° Bé. Après minéralisation, le dosage nécessite 3,93 de SCNNH₄ 0,02 N. Le nitrate d'argent nécessaire à la précipitation du chlore ainsi retenu est donc :

$$4 - 3,93 = 0,07 \text{ cm}^3 \text{ de NO}_3\text{Ag } 0,02 \text{ N}$$

Admettons que le liquide imprégnant l'agitateur a la même composition que le liquide qu'il a servi à agiter ; celui-ci contenait :

$$35,6 \text{ p. } 100 \text{ de globules} = V G$$

$$64,4 \text{ p. } 100 \text{ de plasma} = V P$$

Le dosage nous fournit d'autre part les résultats suivants :

$$\text{Cl G} = 7,39 \text{ g p. } 1000.$$

$$\text{Cl P} = 21,88 \text{ g p. } 1000.$$

$$\text{Cl G S} = \text{Cl G} \times V G = 7,39 \times 0,356 = 2,63 \text{ g}$$

$$\text{Cl P S} = \text{Cl P} \times V P = 21,88 \times 0,644 = 14,09 \text{ g}$$

ce qui montre que le pourcentage contenu dans les globules est :

$$\frac{\text{ClGS} \times 100}{\text{ClGS} + \text{ClPS}} = \frac{2,63 \times 100}{2,63 + 14,09} = 15,7 \text{ p. } 100$$

du ClNa total.

Le nitrate d'argent consommé par les globules restés sur l'agitateur est donc :

$$0,07 \times 0,157 = 0,01099 \text{ cm}^3 \text{ de NO}_3\text{Ag } 0,02 \text{ N}$$

c'est-à-dire sensiblement $0,011 \text{ cm}^3$, ce qui correspond à :

$$\frac{58,5 \times 0,02 \times 0,011}{1000} = 0,01287 \text{ mg de ClNa}$$

L'expérience ayant été effectuée sur 5 cm^3 de sang, le volume globulaire correspondant est :

$$\frac{35,6 \times 5}{100} = 1,78 \text{ cm}^3$$

La teneur en ClNa de $1,78 \text{ cm}^3$ de globules est :

$$\frac{7,39 \times 1,78}{100} = 13,15 \text{ mg}$$

Le chiffre exact doit donc être :

$$13,15 - 0,01287 = 13,13713$$

L'erreur commise est donc :

$$\frac{0,01287 \times 100}{13,15} = 0,098 \text{ p. } 100$$

Elle est inférieure à 1 p. 100, c'est-à-dire pratiquement négligeable. Nous n'en avons jamais tenu compte dans nos calculs.

En procédant comme nous venons de l'indiquer, nous avons toutes les données nous permettant de dresser un bilan sérieux de nos opérations ; les diverses vérifications seront d'ailleurs indiquées au fur et à mesure de l'exposé des faits ; il est ainsi aisé de remarquer que nos résultats expérimentaux concordent en général bien avec les chiffres théoriques, l'écart entre les deux excédant rarement ± 5 p. 100.

V. — *Détermination des volumes globulaires et plasmatiques*

Les expressions $ClGS = ClG \times VG$ et $CIPS = CIP \times VP$, faisant intervenir les volumes globulaires et plasmatiques, permettent respectivement l'évaluation du chlore globulaire et du chlore plasmatique d'un litre de sang. C'est, d'autre part, grâce à la connaissance de ces volumes, qu'ont pu être dressés les bilans de nos expériences, donc être établie la validité des résultats obtenus et des conclusions qui en découlent.

Cette détermination, qui n'est pas simple, peut être faite par un certain nombre de méthodes, dont la plus courante et la plus anciennement connue est celle par centrifugation. Les autres, fondées sur des mesures électriques (SLAWINSKI [109, 110]), réfractométriques, colorimétriques, viscosimétriques..., présentent toutes des inconvénients plus ou moins importants. La plupart ont été pratiquées par PONDER et SASLOW [111, 112, 113] qui les jugent insuffisantes; c'est à ces auteurs qu'il faut se rapporter pour une étude critique de chacune d'entre elles, ainsi qu'à MILLAR [114], pour la discussion de la valeur de la méthode à l'hématocrite.

Nous nous bornerons à dire, avec GUILLAUMIN [7], que si la méthode électrique de SLAWINSKI est originale et intéressante par le caractère relativement rigoureux de ses bases théoriques, elle reste d'une exécution délicate puisqu'elle ne comporte pas moins de trois mesures de conductibilité faites dans des conditions différentes: la première sur le sang total placé dans un tube horizontal, la seconde, sur le sang total maintenu en tube vertical et après sédimentation complète, la troisième sur le plasma. Il s'agit donc d'un procédé qui ne manque pas d'intérêt mais qu'il est peut-être prématuré de prendre comme étalon.

Quant aux méthodes basées sur des dosages chimiques dans le sang additionné de sels, il est évident qu'à moins d'utiliser des solutions rigoureusement isotoniques, le volume globulaire est modifié avant même de commencer la mesure; et les auteurs sont loin d'être d'accord sur la concentration en chlorure de sodium d'une solution isotonique pour les globules rouges. Le principe de ces méthodes, dites méthodes de dilution, est simple: une quantité mesurée d'une substance inerte est ajoutée au sang total et au plasma séparé du même sang. Le volume relatif du plasma et des globules résultera de la comparaison des concentrations de la substance additionnelle dans le plasma, séparé d'emblée, et dans celui qu'on séparera secondairement du sang total. La difficulté est de trouver une substance inerte et aisée à doser. C'est à PONDER et SASLOW que nous sommes redevables de la substance idéale: l'hémoglobine obtenue par cryohémolyse du sang du sujet, c'est-à-dire sans intervention de substances étrangères. Le mode opératoire indiqué par ces auteurs a reçu des perfectionnements par les travaux d'ETTORI et GRANGAUD [116, 117, 118], qui, grâce à l'utilisation d'un hématocrite stroboscopique, ont pu vérifier sa valeur et montrer la concordance des deux méthodes.

Nous ne disposons pas d'hématocrite stroboscopique, pas davantage de photomètre de PULFRICH, nous n'avons donc retenu ni l'une ni l'autre de ces deux techniques, estimant notamment que la nécessité de doser l'hémoglobine colorimétriquement dans la méthode de PONDER et SASLOW enlevait à celle-ci une bonne part de sa précision.

Restait donc la centrifugation pure et simple, et la lecture du volume repéré sur le tube en remplissant celui-ci jusqu'au repaire avec de l'eau débitée par une burette graduée en vingtièmes de centimètre cube. Ce procédé est naturellement loin d'être parfait, comme le prouvent les résultats souvent divergents ainsi obtenus dans la détermination du volume moyen des globules rouges de l'homme. Il est néanmoins possible, si la centrifugation est correcte et les manœuvres successives très soigneusement exécutées, de ne pas dépasser une erreur de ± 5 p. 100, erreur d'ailleurs susceptible d'augmenter légèrement lorsque les globules sont immergés dans des solutions salines.

La concordance,, en général satisfaisante, de nos bilans théoriques et expérimentaux, nous semble justifier le choix du procédé par centrifugation.

VI. — Détermination du pH

Nous avons souvent étudié l'influence du *pH* sur la répartition globulo-plasmaticque des éléments minéraux ou plus exactement recherché ses variations lorsque cette répartition était modifiée.

Toutes nos déterminations ont été effectuées électriquement, c'est-à-dire d'une façon rigoureuse, permettant en général d'apprécier la seconde décimale.

D'ailleurs, le procédé électrique est le seul applicable aux milieux colorés et parfois troubles que constituent les plasmas et les hémolysats globulaires; d'autre part, la rapidité de son exécution est une sécurité contre les modifications possibles en relation avec les échanges de gaz carbonique.

V. — APPLICATION DE LA MÉTHODE CRYOSCOPIQUE
A L'ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES OSMOTIQUES
PRODUITS PAR LES ANTICOAGULANTS

Les expériences de **RAOULT** ont montré que l'abaissement cryoscopique d'une solution d'un non électrolyte peut être représenté par la relation:

$$\Delta t = t_s - t_o = K \cdot \frac{c}{M} \quad (1)$$

dans laquelle t_s représente la température de congélation de la solution, t_o , celle du solvant pur, M est la masse moléculaire du corps dissous, c , la concentration en grammes du corps dissous pour 1000 cm³ du solvant; K est une constante caractéristique du solvant.

Le rapport $\frac{c}{M}$ est appelé concentration moléculaire.

La formule de **RAOULT** montre donc que l'abaissement cryoscopique ne dépend pas de la nature du corps dissous, mais seulement de sa concentration moléculaire.

Remarquons que cette relation, obtenue expérimentalement, peut se déduire théoriquement des principes de la thermodynamique par application de ceux-ci aux solutions

étendues non électrolysables. VAN T'HOFF a ainsi établi la formule :

$$\Delta t = \frac{J. L.}{R. T^2} \cdot \frac{c}{M}$$

qui se rattache à l'équation (1) en faisant $K = \frac{R.T^2}{J.L}$

c'est-à-dire en rattachant la constante expérimentale de RAOULT aux propriétés physiques du solvant; dans cette dernière expression :

R = constante des gaz parfaits = $8,32 \times 10^7$ C.G.S.

L = chaleur latente de fusion du solvant.

T_0 = température absolue de congélation du solvant.

J = équivalent mécanique de la calorie = $4,18.10^7$ C.G.S.

Dans le cas de l'eau: $T_0 = 273$

$L = 80$

D'où la constante K :

$$K = \frac{8,32 \times 10^7 \times (273)^2}{4,18 \times 10^7 \times 80} = 1,86$$

D'autre part, l'expérience montre que l'abaissement cryoscopique d'une solution contenant 1 molécule-gramme de corps dissous par litre de solution est de 1,87, ce qui est une excellente justification des considérations thermodynamiques de VAN T'HOFF.

La loi de RAOULT, base de la cryoscopie, n'est d'ailleurs pas générale sous la forme indiquée par l'équation (1). Il faut, pour étendre son application aux électrolytes, introduire un coefficient correcteur qui tienne compte de l'ionisation, c'est-à-dire de la multiplication des particules élémentaires; ce coefficient i , spécifique du corps dissous et de la solution varie usuellement entre 1 et 3; il est appelé

coefficient d'ionisation (1). La forme générale de la loi de RAOULT sera donc représentée par :

$$\Delta t = K \cdot i \cdot \frac{c}{M} \quad (3)$$

Les recherches expérimentales de PFEFFER, de VRIES et les calculs de VAN T'HOFF et ARRHÉNIUS conduisent à exprimer la pression osmotique d'une solution par la relation générale :

$$p = R.T.i \cdot \frac{c}{M} \quad (4)$$

avec $i = 1$ pour les non électrolytes.

De la formule (3) on tire : $i \cdot \frac{c}{M} = \frac{\Delta t}{K}$

d'où $p = \frac{R.T}{K} \cdot \Delta t$ et par suite à température constante :

$$p = K' \Delta t$$

(1) Connaissant le degré de dissociation exprimé par la relation :

$\alpha = \frac{\lambda^c}{\lambda^\infty}$, il est facile de calculer le coefficient i . En effet, n molécules donneront en solution $n \cdot \alpha$ molécules dissociées qui donneront elles-mêmes $n \cdot \alpha \cdot \gamma$ ions.

($\gamma = 2$ pour ClNa , 3 pour SO_4Na_2 , etc.).

On a donc dans la solution un nombre total de particules N représenté par :

$$\begin{cases} n - \alpha n = n (1 - \alpha) \text{ molécules non dissociées.} \\ n \cdot \alpha \cdot \gamma \text{ ions.} \end{cases}$$

Donc :

$$N = n - \alpha n + n \alpha \gamma = n [\alpha (\gamma - 1) + 1].$$

$$\text{et } i = \frac{N}{n} = 1 + \alpha (\gamma - 1).$$

Cette importante formule montre qu'on peut substituer à des mesures directes de pression osmotique toujours fort délicates des mesures cryoscopiques d'un usage courant.

Dans le cas des solutions aqueuses, en adoptant une fois pour toutes comme température celle de congélation du solvant, c'est-à-dire de l'eau pure, on a :

$$K' = \frac{8,32 \times 10^7 \times 273}{1,87 \times 10^3} = 1200 \times 10^7$$

Et la pression osmotique, exprimée en unités C. G. S. sera :

$$p = \frac{1200 \times 10^7}{10^3} \cdot \Delta t = 12 \times 10^6 \cdot \Delta t \text{ C. G. S.}$$

$$12 \times \Delta t \text{ atmosphères.}$$

La formule $p = 12 \cdot \Delta t$ exprime la pression osmotique à la température de congélation du solvant, si on veut l'avoir à une température quelconque t , on utilise la formule de MORSE, calquée sur celle de Charles :

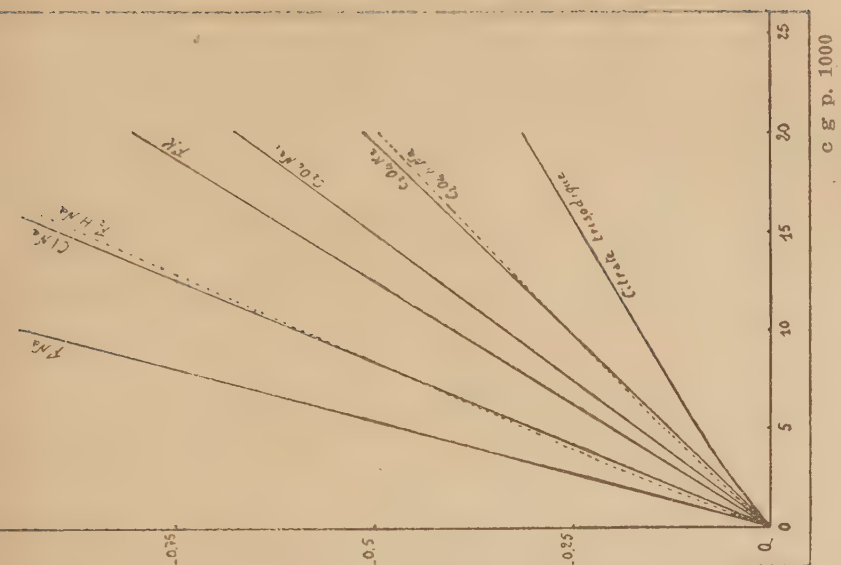
$$p = p_0 (1 + \alpha t)$$

et par, exemple, à 15° :

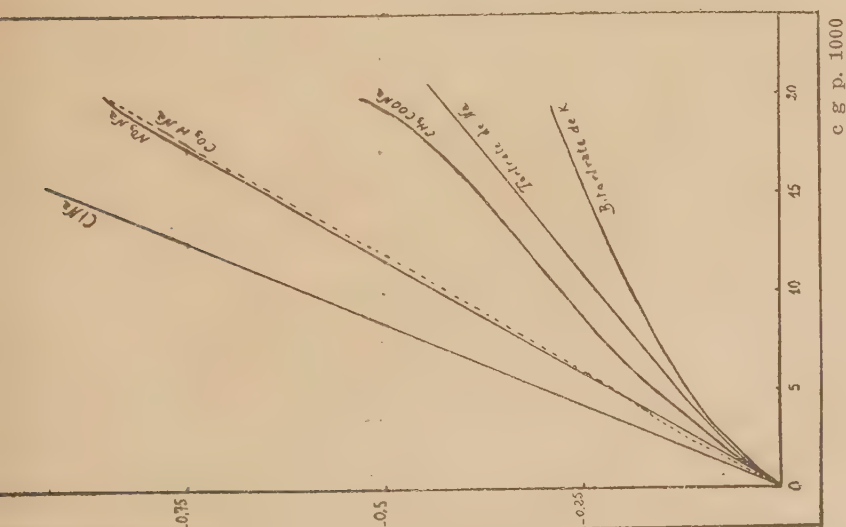
$$p = 12 \cdot \Delta t + \frac{12 \cdot \Delta t \times 15}{273} = 12,5 \cdot \Delta t.$$

Ces diverses relations ne sont d'ailleurs valables que pour des solutions peu concentrées, ce qui était en général le cas dans nos expériences.

Il résulte de ces considérations théoriques que l'effet osmotique d'une substance en solution peut être apprécié indirectement par la détermination de l'abaissement cryoscopique de cette solution, celui-ci pouvant être à son tour



Variations des abaissements cryoscopiques
de quelques anticoagulants
en fonction des concentrations



Variations des abaissements cryoscopiques
de quelques électrolytes
en fonction des concentrations

calculé en fonction des propriétés physiques du solvant et de l'état ionique de la solution (coefficient d'ionisation et concentration moléculaire). Il nous était donc possible d'utiliser ces résultats pour établir les correspondances osmotiques entre les électrolytes que nous avons étudiés ; toutefois, et quoique cette manière de procéder eut été théoriquement légitime, nous avons tenu à établir expérimentalement les courbes de cryoscopie en fonction des concentrations (graphiques I et II).

Nous avons, à l'occasion, vérifié la concordance des résultats théoriques et expérimentaux, concordance qui n'est pas toujours satisfaisante.

Ces courbes permettent immédiatement de déterminer les concentrations nécessaires à l'obtention d'électrolytes osmotiquement équivalents et correspondants en particulier à certaines concentrations de ClNa . Il suffit pour cela de mener une parallèle à l'axe des abscisses, passant par un point d'ordonnée correspondant à l'abaissement cryoscopique choisi. Cette droite coupe les courbes en des points dont les abscisses indiquent les concentrations cherchées.

Les graphiques I et II montrent que les courbes $\Delta = f(c)$ sont souvent des droites, ce qui n'est pas surprenant, puisqu'il s'agit en général de solutions peu concentrées, les seules pour lesquelles les lois théoriques de **RAOULT** et de **VAN T'HOFF** sont applicables (1).

(1) Diverses relations ont été proposées pour généraliser aux solutions concentrées les formules de la pression osmotique; signalons notamment celle de Van der Waals-Sackur: $p(V-b) = R.T.$ et l'équation de Dieterici, facile à établir à partir de la théorie cinétique : $p(V-b) = R.T.e^{-A}$ avec $A = \frac{K}{T^n} \cdot V$, n étant une caractéristique de la substance.

Ces deux expressions cadrent assez bien avec les faits.

Nous avons appliqué directement au sérum la méthode cryoscopique, ces mesures étant considérées comme indice de la concentration moléculaire totale et permettant, par exemple dans le cas de constance de l'abaissement cryoscopique et de variation du chlore plasmatique, d'admettre la substitution à l'ion chlore d'un autre ion en quantité osmotiquement équivalente.

Nous serons très bref sur la technique cryoscopique elle-même, toujours effectuée par le dispositif classique de RAOULT-BECKMANN dont VLES [119] donne une description détaillée. L'utilisation du phénomène de surfusion rend la mesure infiniment plus aisée et permet d'éviter une surveillance constante du refroidissement. L'expérience est toujours plus délicate avec le plasma, ce qui tient vraisemblablement au fait qu'on n'a pas affaire à une solution vraie, on a par suite un refroidissement moins homogène. Nous avons naturellement, avant chaque série de mesures effectuées consécutivement, vérifié le zéro du thermomètre, c'est-à-dire noté le point de congélation de l'eau bidistillée.

VI. CHOIX DES ÉLECTROLYTES

Nous avons, pour cela, été guidé par les considérations suivantes :

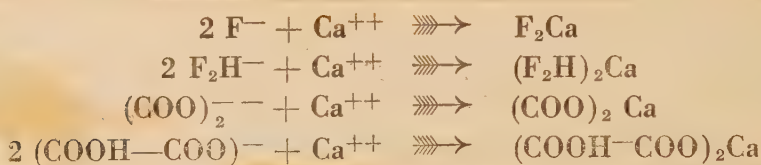
1° Etudier systématiquement les électrolytes minéraux pourvus de propriétés anticoagulantes. Les plus couramment utilisés sont :

- a) Le fluorure de sodium : FNa .
- b) L'oxalate de sodium : COONa-COONa .
- c) L'oxalate de potassium : COOK-COOK .
- d) Le citrate trisodique :
 $\text{COONa-CH}_2\text{-COH (COONa)-CH}_2\text{-COONa}$

C'est eux que nous avons envisagé tout d'abord ; mais il convenait, en raison du caractère ionique de leur action, d'étendre cette étude à des sels à peine différents et notamment :

- a) Le fluorure acide de sodium : F_2HNa .
- b) Le fluorure de potassium : FK .
- c) Le fluorure acide de potassium : F_2HK .
- d) L'oxalate acide de sodium : $COOH-COONa$.
- e) L'oxalate acide de potassium : $COOH-COOK$.

Les propriétés anticoagulantes de ces différents sels sont schématisées par les équations ioniques ci-dessous :



Quant à l'ion citrique, il intervient en formant avec le calcium un complexe dans lequel celui-ci est désionisé, donc ne peut plus remplir son rôle dans la coagulation.

2°) Le polyanéthol-disulfonate de sodium est un électrolyte très faiblement dissocié. Ses propriétés le rapprochent des anticoagulants du type antiferment, son mode d'action n'est pas connu. Nous avons tenu à étudier systématiquement l'effet de son addition au sang afin de nous faire une opinion autorisée sur l'opportunité de le considérer comme *l'anticoagulant idéal*.

3°) Désireux de généraliser les faits constatés et les conséquences qu'ils entraînent, nous avons enfin considéré quelques électrolytes minéraux ou organiques non doués de propriétés anticoagulantes :

- a) Le chlorure de sodium : $ClNa$.
- b) Le nitrate de sodium : NO_3Na .
- c) L'acétate de sodium : $CH_3-COONa$.

d) Le bicarbonate de sodium : CO_3HNa .

e) Le tartrate de sodium : $\text{COONa-CHOH-CHOH-COONa}$.

f) Le bitartrate de potassium : $\text{COOH-CHOH-CHOH-COOK}$.

L'examen de ces trois groupes de substances montrẽ que nous avons cherchẽ à mettre en ẽvidence :

1°) Le rˆle de l'anion par le rapprochement de l'action de sels d'un mˆme mẽtal :

le sodium FNa , $(\text{COONa})_2$, ClNa , NO_3Na , $\text{CH}_3\text{-COONa}$, CO_3HNa , COONa , CHOH-CHOH-COONa ,

ces sels ẽtant tous ioniquement neutres.

2°) Le rˆle du cation par l'ẽtude comparẽe de FNa et FK ; COONa-COONa et COOK-COOK .

3°) L'effet de l'aciditẽ en comparant FNa et F_2HNa ; FK et F_2HK ; COONa-COONa et COOH-COONa ; COOK-COOK et COOH-COOK .

4°) Les effets combinẽs du cation et de l'aciditẽ, en rapprochant $\text{COONa-CHOH-CHOH-COONa}$ de $\text{COOH-CHOH-CHOH-COOK}$, ces deux sels correspondant à des poids molẽculaires voisins (188 pour le bitartrate de potassium et 194 pour le tartrate de sodium) et par suite, le rˆle de la diffusibilitẽ de l'anion, fonction comme nous le verrons du poids molẽculaire qui est dans les deux cas pratiquement le mˆme.

En possession des donnẽes aussi bien thẽoriques que pratiques concernant les principes et les modalitẽs d'exẽcution de notre expẽrimentation, nous sommes en mesure d'aborder dans le prochain chapitre, le compte rendu proprement dit de nos recherches.

CHAPITRE III

ETUDE DES TEMOINS

Afin de pouvoir apprécier les effets de l'addition au sang d'une substance anticoagulante, nous avons dû rapporter les écarts constatés à un échantillon adopté comme référence, que nous appelons témoin, c'est-à-dire à du sang recueilli selon un procédé qui permette une conservation correcte de l'état existant « *in vivo* » et qui soit applicable à notre mode expérimental.

Certains auteurs ont admis comme témoin, du sang traité par un anticoagulant considéré sans action sur le rapport chloré globulo-plasmatic. PAGET [1] a choisi dans ce but l'hirudine. Cette substance est malheureusement difficile à obtenir et d'un prix le plus souvent prohibitif. En outre, du moins du point de vue théorique, il n'est pas certain, *a priori*, qu'elle n'altère pas la répartition du chlore.

D'autres expérimentateurs et notamment CHORINE [15, 16], ont recueilli le sang dans un tube paraffiné sans addition d'anticoagulant. Ce procédé est, à coup sûr, excellent, mais difficile à réaliser si l'on a besoin d'une quantité importante de sang.

Enfin, certains d'entre eux (EISENMAN [4], GUILLAUMIN [6], et BLITSTEIN [10], emploient comme témoin, du

sang défibriné. Nous avons adopté cette manière d'opérer car elle permet d'obtenir de façon homogène toute la quantité de sang que l'on désire.

On a fait à ce procédé de multiples objections. Une des plus importantes faite à BLITSTEIN [10, p. 154], est que *« le battage du sang favorise le départ du CO_2 sanguin, d'où par suite du phénomène de HAMBURGER des modifications dans la teneur en chlore du plasma et des globules rouges »*.

Quelle que soit la valeur de cette objection que nous allons discuter, disons immédiatement que dans toutes nos expériences, l'anticoagulant a été ajouté dans le même sang défibriné ; si donc modifications il y a eu, celles-ci étaient les mêmes pour tous les échantillons, et il était légitime de ne pas en tenir compte.

Mais considérons l'objection elle-même. BLITSTEIN écrit : *« Les expériences de comparaison entre le sang hirudiné ou hépariné, ces deux derniers étant considérés comme les moins modifiés, ont montré qu'on peut parfaitement les substituer, du moins pour les éléments qu'ils permettent de rechercher. Le phénomène de HAMBURGER devait nécessairement intervenir dans nos expériences. Pour nous mettre à l'abri de cette cause d'erreur, dans beaucoup de nos expériences, j'ai ajouté l'anticoagulant au sang préalablement défibriné dans lequel la tension du CO_2 était déjà diminuée par battage »*.

Nous rappelons que c'est exactement ce que nous avons fait dans toutes nos expériences. Cette précaution pourrait paraître inutile si on en croit EISENMAN [4], d'après lequel on obtient les mêmes résultats si on oxalate le sang après défibrination ou si l'on compare le sang défibriné et le sang oxalaté non défibriné.

Quoi qu'il en soit, déjà en 1920, E. J. WARBURG [120], a montré que l'on trouve la même répartition de chlore (et de bicarbonates) dans le sang hirudiné que dans le sang défibriné. A vrai dire, en vérifiant ses résultats, on trouve une petite différence :

$$\text{Sang hirudiné.} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{Cl P} = 108 \text{ millimolécules} \\ \text{Cl G} = 63 \text{ millimolécules} \end{array} \right.$$

$$\text{D'où un rapport } \frac{\text{Cl G}}{\text{Cl P}} = 0,58$$

$$\text{Sang défibriné} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{Cl P} = 107 \text{ millimolécules} \\ \text{Cl G} = 66 \text{ millimolécules} \end{array} \right.$$

$$\text{D'où un rapport } \frac{\text{Cl G}}{\text{Cl P}} = 0,61$$

soit une différence de + 5,1 p. 100 en faveur du sang défibriné. Il est vrai que le sang défibriné avait été saturé de CO_2 sous 15 mm. de Hg.

Il est alors intéressant de se rapporter à HAMBURGER lui-même et de noter ce qu'il écrivait en 1893 [68] : « *Le sang défibriné doit être considéré comme du sang vivant. L'étude des corpuscules et du plasma peut être remplacée par celle des corpuscules et du sérum du sang défibriné, à condition d'effectuer la défibrination à l'abri de l'air* ». C'est pourquoi EISENMAN a imaginé un appareil pour la défibrination anaérobie.

Mais cet appareil fragile et compliqué peut être facilement remplacé par la simple agitation dans un flacon bouché et plein de sang, comme le faisait HAMBURGER lui-même. C'est le mode opératoire que nous avons toujours

suivi. Dans ces conditions, on s'aperçoit que le rapport chloré globulo-plasmatique du sang après défibrination aérobie est plus fort de 4,9 p. 100 que le même rapport du sang après défibrination anaérobie.

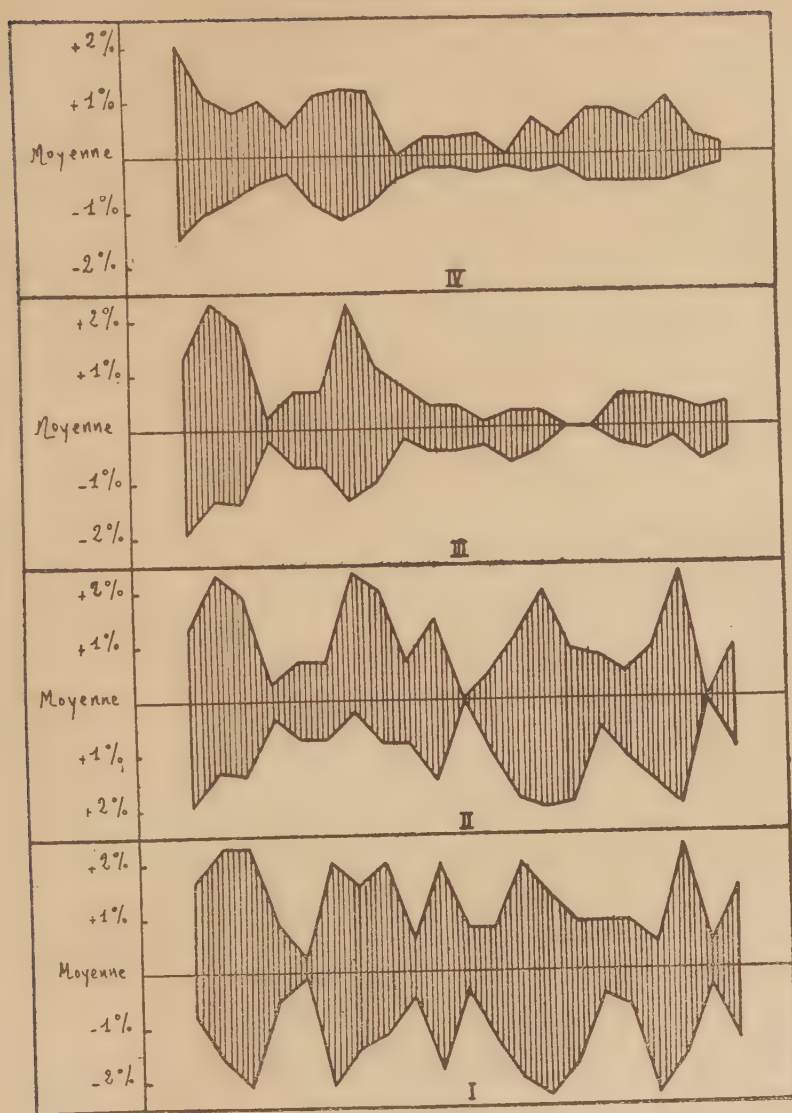
Si nous rappelons que d'après WARBURG [120] le sang défibriné saturé de CO_2 sous 15 mm. de Hg. a un rapport Cl G/Cl P supérieur de 5,1 p. 100 à celui du sang hirudiné, nous devons conclure que le phénomène de HAMBURGER s'est bien produit dans le sang hirudiné et que le seul témoin théoriquement irréprochable est donc du sang défibriné à l'abri de l'air.

Des travaux de FREDERIQ [121] et HAMBURGER, on peut d'ailleurs conclure que la distribution des chlorures, des carbonates et des bicarbonates est la même dans le sang défibriné que dans le sang circulant.

Une autre objection doit être prise en considération. Dans nos expériences, nous prélevons de nombreux échantillons dans le même sang. Pouvons-nous espérer avoir du sang suffisamment homogène pour qu'il contienne la même proportion de globules et de plasma, donc de chlore globulaire et plasmatique quels que soient les échantillons. Il est bien évident qu'une marge d'erreur, d'ailleurs peu considérable, doit être considérée comme inévitable. Ce qui est plus grave, c'est qu'AMBARD a montré qu'il est impossible, même par une agitation aussi prolongée qu'on le voudra, d'obtenir à nouveau un mélange homogène en partant d'un sang qui a commencé sa sédimentation. Or cette sédimentation s'amorce aussitôt après le prélèvement, et elle est particulièrement rapide dans les azotémies graves.

Mais si cela est vrai pour le sang oxalaté, il n'en est pas de même pour le sang défibriné, ce qui est d'ailleurs heureux, car s'il n'en était pas ainsi, il serait non seulement

GRAPHIQUE III



Variations des témoins autour de la valeur moyenne

- I. — Rapport G/P.
- II. — Chlore du sang total.
- III. — Cl G S.
- IV. — Cl P S.

Sur chaque portion du graphique, les traits supérieurs et inférieurs représentent les limites extrêmes de variation; tous les écarts possibles par rapport à la moyenne sont, pour une même expérience, sur une ligne verticale.

impossible d'obtenir des dosages concordants quelques minutes après la défibrination, mais surtout de pouvoir les comparer quelques heures après ; notre témoin n'aurait alors aucune valeur et ne pourrait nous permettre d'étudier l'influence de temps de contact des anticoagulants.

Or, nos nombreuses déterminations dont quelques-unes sont réunies dans le graphique III montrent que le rapport Cl G/Cl P et le chlore du sang total peuvent être évalués dans plusieurs échantillons de sang au cours des 24 heures qui suivent la ponction veineuse avec une très bonne approximation. L'écart avec la valeur moyenne ne dépasse pas ± 2 p. 100. En d'autres termes, cela veut dire qu'un rapport globulo-plasmatique de 0,50 est en réalité compris entre 0,49 et 0,51.

Cette constance dans les résultats n'est pas due au hasard des répartitions inégales de chlore entre le plasma et les globules, mais bien à la constance des concentrations chlorées des globules et du plasma, comme l'indique également le graphique III.

Il reste alors à savoir si les bilans sont exacts, c'est-à-dire si l'on retrouve toujours avec une bonne approximation, la même quantité de chlore dans le sang total. Le graphique III nous montre toujours que les écarts maxima et tout à fait exceptionnels sont de ± 2 p. 100 et $\pm 2,5$ p. 100 les écarts habituels n'atteignant pas 1 p. 100.

De ces diverses constatations résultent les conclusions suivantes :

I. Avec le sang défibriné, le rapport Cl G/Cl P peut être déterminé dans plusieurs échantillons du même sang au cours de 24 heures, avec une très bonne approximation de ± 2 p. 100.

II. La même approximation se retrouve dans les déterminations du chlore globulaire, du chlore plasmatique et

du chlore du sang total calculé en tenant compte des volumes globulaires et plasmatiques. Il s'ensuit que ces deux volumes restent également fixées à ± 2 p. 100 près.

III. Dans l'étude de l'action d'une substance ajoutée au sang défibriné sur le rapport Cl G/Cl P ne doivent être attribuées à cette substance que des variations du rapport excédant ± 2 p. 100.

Comment concilier nos résultats avec l'affirmation d'AMBARD et de THIERS [5] ? Par les travaux de EISENMAN [4] qui a étudié la vitesse de sédimentation du sang oxalaté et du sang défibriné ; dans une expérience au bout de deux heures, le volume du sérum dans le sang défibriné était de $0,02 \text{ cm}^3$ tandis que celui du plasma dans le sang oxalaté était de $0,18 \text{ cm}^3$; dans une autre, la sédimentation du sang oxalaté est complète en 8 heures, tandis qu'en 50 heures, celle du sang défibriné ne l'est pas encore.

La constance de nos résultats est donc expliquée par la lenteur de la sédimentation du sang défibriné, c'est-à-dire par son aptitude à reformer une suspension homogène. Il semble bien que la fibrine restant dans le plasma est la cause de la sédimentation rapide dans le sang oxalaté, puisque si l'on ajoute de l'oxalate à du sang défibriné, en deux heures le volume de sérum est approximativement le même que dans le sang défibriné témoin (EISENMAN). Il s'ensuit que tous les anticoagulants ont sur la sédimentation un effet analogue à celui de l'oxalate.

Enfin, on pourrait penser que les phénomènes d'acidification, compensés d'ailleurs par une perte de CO_2 dans l'air, possibles dans le sang au cours des 24 heures qui suivent le prélèvement, déterminent une modification du

chlore plasmatique (1) et partant, du rapport $Cl\ G/Cl\ P$. Nos expériences et le graphique III montrent que ce phénomène, s'il existe, n'est pas assez important pour déterminer un écart notable des valeurs primitives.

Ces considérations et nos constatations légitiment donc l'emploi du sang défibriné (à l'abri de l'air) comme témoin dans notre étude.

(1) Comme nous l'avons déjà signalé, nous emploierons dorénavant le mot plasma, quoiqu'il soit incorrect, pour nous conformer à l'habitude et ne pas introduire un nouveau rapport chloré qui s'identifie pleinement quant aux résultats avec le rapport chloré globulo-plasmatique.

CHAPITRE IV.

ETUDE DES PRINCIPAUX ANTICOAGULANTS RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. GÉNÉRALITÉS

Nous avons consacré ce chapitre à l'exposé des résultats concernant les anticoagulants, c'est-à-dire :

- 1°) Les oxalates de Na et de K.
- 2°) Les fluorures de Na et de K.
- 3°) Le citrate trisodique.
- 4°) Le liquoïde.

Nous compléterons les données ainsi acquises par l'étude des bifluorures et des bioxalates ; nos conditions expérimentales nous permettront de mettre en évidence les rôles respectifs des cinq facteurs suivants :

- 1°. — Concentration de l'anticoagulant.
- 2°. — Temps de contact avec le sang.
- 3°. — Etat physique sous lequel il est ajouté au sang.
- 4°. — Acidité du milieu et de l'anticoagulant.
- 5°. — Nature de l'ion anticoagulant.

Remarquons d'ailleurs que nous avons tenu à préciser la part respective de chacune de ces données non pour elles-mêmes, mais surtout pour pouvoir dresser une interprétation d'ensemble cohérente, qui tienne compte au

maximum de toutes les conditions susceptibles d'intervenir.

1. — *Les produits utilisés.*

Nous avons employé :

a) Sodium oxalate neutre R. P. contenant p. 100 99,5 de $C_2O_4Na_2$.

b) Potassium oxalate neutre R. P. contenant p. 100 99,5 de $C_2O_4K_2$, H_2O .

c) Sodium fluorure neutre R. P.

d) Potassium fluorure neutre R. P.

e) Sodium citrate (trisodique) R. P. contenant p. 100 99,5 de $(C_6H_5O_7Na_3)_2 \cdot 11H_2O$.

f) Liquoïde « Roche ».

g) Sodium oxalate acide R. P.

h) Sodium fluorure acide R. P.

2. — *Concentration et temps de contact
des anticoagulants*

Les concentrations étudiées ont été :

— 1, 2, 3, 4, 5 p. 1000 pour les oxalates, fluorures, bioxalates et bifluorures alcalins,

— 1, 3, 5, 10, 15, 20 p. 1000 pour le citrate trisodique,

— 0,2, 0,3, 0,5, 1 p. 1000 pour le liquoïde.

Ces doses représentent une marge suffisante pour l'étude du phénomène, les valeurs extrêmes correspondant aux limites susceptibles d'être employées pour empêcher la coagulation, souvent même elles les dépassent largement et nous permettent ainsi d'extrapoler, c'est-à-dire de mieux interpréter les faits.

Quant aux choix des temps de contact, trois considérations nous ont guidé :

— D'une part, observer le début de l'expérience, c'est-à-dire voir ce qui se passe immédiatement après l'introduction de l'anticoagulant et dans les instants qui suivent, c'est-à-dire après des temps de contact de 0 et 1 heure.

— D'autre part, noter le phénomène en pleine évolution, vers le rétablissement du nouvel équilibre, soit au bout de trois heures de contact.

TABLEAU III

	Concentration de l'anticoagulant en g p. 1000	Temps de contact en heures				
		0	1	3	17	24
Cl G	1	+ 2,3	— 3,0	+ 0,5	+ 1,3	— 0,3
	2	— 7,1	— 7,1	— 2,0	— 2,0	— 3,0
	3	— 7,1	— 9,0	— 9,6	— 8,0	— 4,7
	4	— 4,7	— 7,7	— 5,8	— 1,7	— 2,0
	5	— 3,7	— 6,0	— 6,0	— 6,0	— 6,0
V G	1	— 7,1	— 8,6	— 5,5	— 5,5	— 4,0
	2	— 8,6	— 11,7	— 14,8	— 14,8	— 14,8
	3	— 11,7	— 11,7	— 11,7	— 8,6	— 11,7
	4	— 14,8	— 25,6	— 17,9	— 16,4	— 19,5
	5	— 19,5	— 13,3	— 16,4	— 17,9	— 16,4
Cl P S	1	— 7,0	— 11,5	— 5,3	— 5,3	— 5,3
	2	— 15,0	— 17,6	— 17,6	— 16,8	— 17,6
	3	— 17,6	— 20,3	— 22,6	— 16,5	— 15,9
	4	— 19,4	— 29,1	— 23,8	— 19,4	— 22,1
	5	— 23,8	— 19,4	— 22,1	— 23,8	— 22,1
V P	1	+ 3,3	+ 4,1	+ 2,6	+ 2,6	+ 1,9
	2	+ 4,1	+ 5,6	+ 7,0	+ 7,0	+ 7,0
	3	+ 5,6	+ 5,6	+ 5,6	+ 4,1	+ 5,6
	4	+ 7,0	+ 12,2	+ 8,5	+ 7,1	+ 9,3
	5	+ 9,3	+ 6,3	+ 7,8	+ 8,5	+ 7,8
Cl G S	1	+ 2,0	+ 3,7	+ 2,2	+ 1,3	+ 0,6
	2	+ 4,6	+ 6,0	+ 5,7	+ 7,5	+ 6,6
	3	+ 6,0	+ 4,4	+ 3,3	+ 2,8	+ 5,1
	4	+ 6,6	+ 10,2	+ 7,5	+ 6,0	+ 7,7
	5	+ 7,7	+ 4,9	+ 6,4	+ 7,1	+ 6,4

RÉSULTATS CONCERNANT L'OXALATE DE SODIUM

— Enfin, saisir cet équilibre final résultant de la substitution d'un nouvel état physico-chimique définitif et stable à l'état du sang initial ; ceci est pratiquement réalisé au bout de 15 à 18 heures. Nous avons toujours étudié le phénomène au bout de 17 et de 24 heures de contact, ce qui représente une marge de sécurité suffisante nous permettant de considérer l'état obtenu comme l'équilibre terminal.

II. OXALATE DE SODIUM

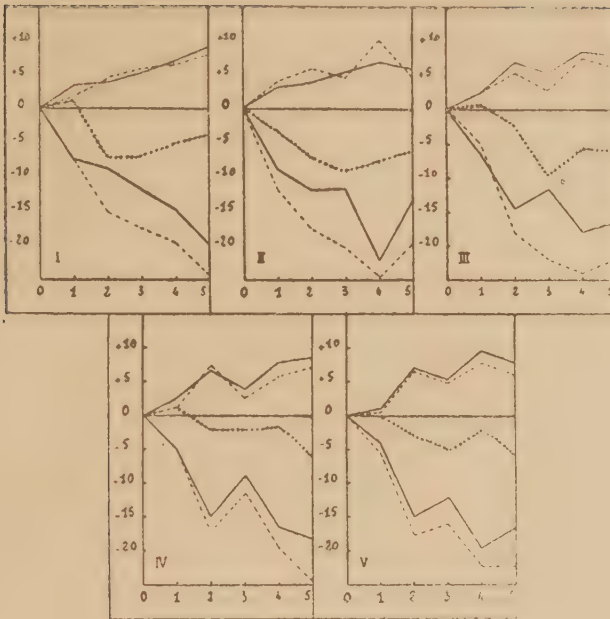
Nos expériences ont été conduites, avons-nous dit, de façon à mettre en évidence la double influence de la concentration de l'anticoagulant et du temps de contact de celui-ci avec le sang.

Le tableau III résume quelques-uns des résultats obtenus. Seuls sont mentionnés les pourcentages de variations. Selon qu'on le lit dans le sens horizontal ou vertical, il permet de construire les deux groupes de courbes représentées sur les graphiques IV et V.

On constate que les courbes représentant les variations du rapport globulo-plasmatique en fonction de la concentration de l'oxalate affectent la forme d'un U à branches inégales pour des temps de contact de 0, 1 et 3 heures, et celle d'un S allongé pour les temps de 17 et 24 heures, ce qui montre que pour des temps de contact identiques, le même équilibre n'est pas atteint avec des concentrations différentes. Ce fait se voit également avec netteté sur les courbes du graphique V qui montrent de plus que les équilibres correspondant à une concentration déterminée dépendent du temps de contact.

D'une manière générale, au bout d'un temps de contact suffisant inférieur ou égal à une vingtaine d'heures, le

GRAPHIQUE IV



Oxalate de Na :

Variations en fonction de la concentration de l'anticoagulant.

I. —	Temps de contact:	0	heure.
II. —	—	2	—
III. —	—	3	—
IV. —	—	17	—
V. —	—	24	—

———— { Courbe supérieure : Volume plasmatique.
 { Courbe inférieure : volume globulaire.
 - - - - - { Courbe supérieure : Chlore du plasma d'un litre de sang
 { Courbe inférieure : Chlore des globules d'un litre de sang.
 + + + + + Rapport chloré globulo-plasmatique.

Abscisses: Concentrations en g p. 1000.
 Ordonnées: Pourcentages de variation.

rapport tend à se rapprocher du rapport initial et cela d'autant plus et d'autant plus vite qu'est plus faible la concentration en $C_2O_4Na_2$. Cependant, l'abaissement du rapport n'est pas en général proportionnel (dans le même temps donné) à la concentration de l'anticoagulant ; le rapport G/P est en effet le plus souvent abaissé au dessous de la moyenne ou bien voisin de cette dernière (et pratiquement assimilable à elle). Mais dans certains cas (1 heure), on note une élévation du rapport pour des concentrations de 1 à 3 p. 1000 en $C_2O_4Na_2$. Cette élévation n'a pas été signalée dans les travaux antérieurs dont les auteurs décrivent, tous, une diminution. Nous en rechercherons ultérieurement la cause.

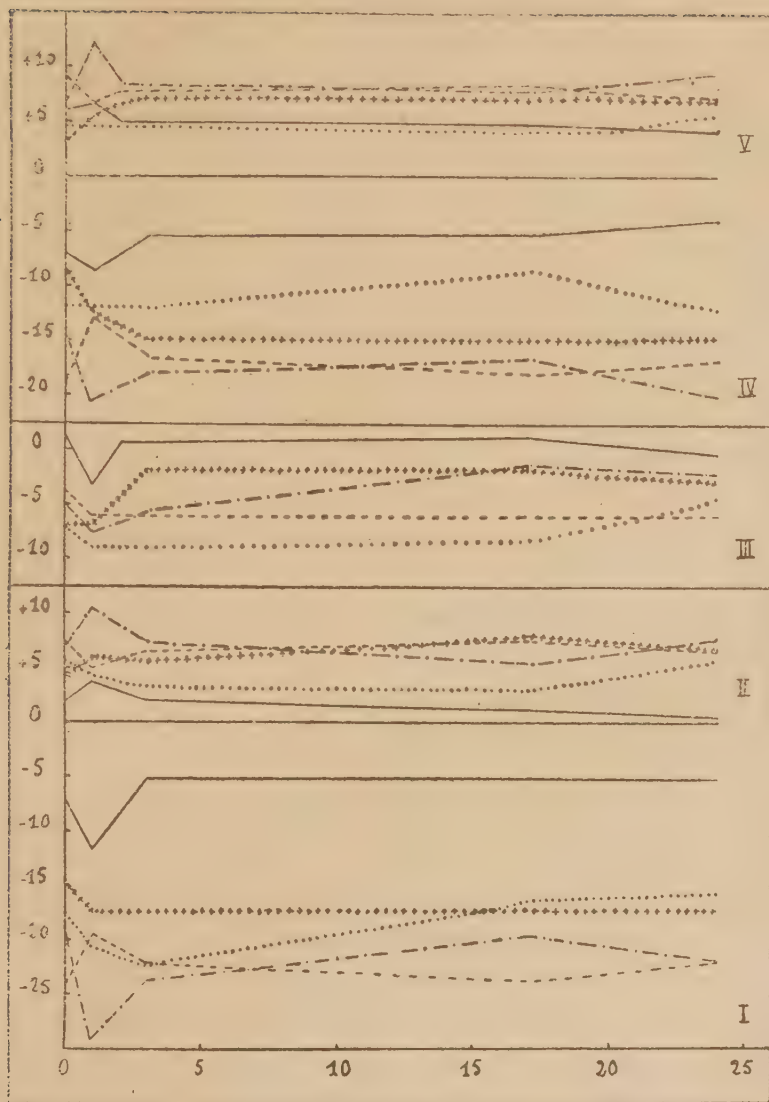
Mais essayons de préciser encore ces données en dissociant les éléments du rapport G/P et en prenant en considération les échanges d'eau. Les graphiques IV et V indiquent en effet également les variations de l'eau globulaire et de l'eau plasmatique (pratiquement volume globulaire et volume plasmatique) du chlore contenu dans les globules d'un litre de sang (Cl G S) et du chlore contenu dans le plasma d'un litre de sang (Cl P S), sous la double influence de la concentration de l'anticoagulant et de son temps de contact avec le sang.

1. Influence de la concentration de l'anticoagulant pour des temps de contact identiques

I. Les variations de l'eau plasmatique (V P) et du Cl P S sont sensiblement parallèles comme aussi celles de l'eau globulaire et du Cl G S.

II. Les variations de V P et Cl P S sont respectivement inverses de celles de V G et Cl G S.

GRAPHIQUE V



Oxalate de Na: Variations en fonction du temps de contact.

I. — Chlore des globules d'un litre de sang.	—	$C_2O_4Na_2$	1 p. 1000
II. — Chlore du plasma d'un litre de sang.	+++	—	2 —
III. — Rapport chloré globulo-plasmatique.		—	3 —
IV. — Volume globulaire.	—	—	4 —
V. — Volume plasmatique.	---	—	5 —

{ Abscisses: Temps en heures.
 { Ordonnées: Pourcentages de variation.

En somme, l'oxalate de sodium provoque une sortie d'eau et de chlore des globules et la quantité sortie est grossièrement proportionnelle à la concentration de l'oxalate avec des écarts dus aux inévitables erreurs expérimentales ; nous interpréterons plus loin ce fait constaté par la plupart des auteurs.

III. Les variations du rapport G/P résultent nécessairement des deux précédents et de leur importance relative, c'est ainsi qu'en général elles suivent celles du Cl G S et s'en éloignent d'autant plus qu'augmente la concentration de l'anticoagulant, il s'agit là d'un résultat assez général, nous aurons l'occasion d'y revenir.

2. Influence du temps de contact pour une même concentration de l'anticoagulant

I. Les courbes de variation du rapport G/P sont sensiblement identiques, quelle que soit la concentration de l'anticoagulant, elles indiquent en général :

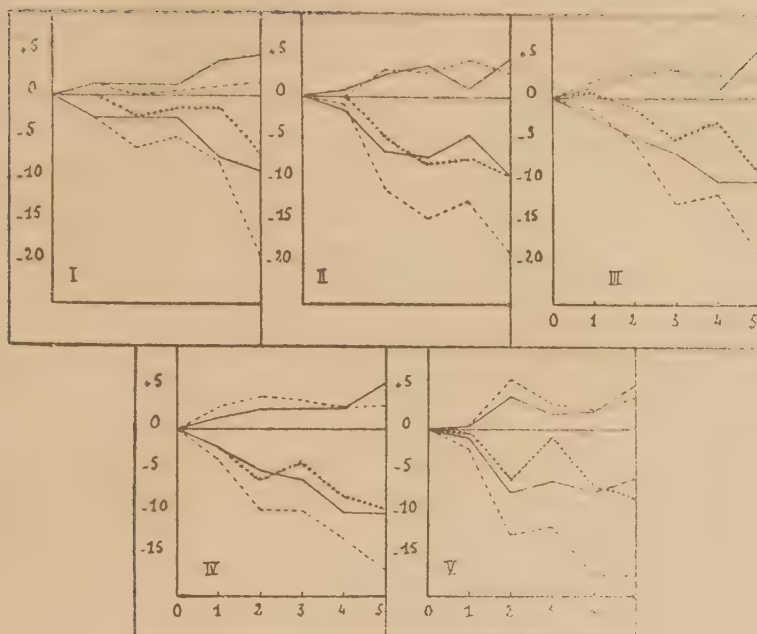
- a) Diminution du rapport dans la première heure.
- b) Augmentation jusqu'à la 3^e ou la 17^e heure.
- c) Légère diminution ou palier de la 17^e à la 24^e heure.

Remarquons toutefois que l'oxalate de sodium à 1 p. 1000 ne cause que des variations minimales du rapport avec maximum à 1 heure (ce qui est d'ailleurs le cas pour à peu près toutes les concentrations).

Pour toutes les autres concentrations, nos courbes montrent le danger de parler d'un « effet de l'oxalate » sans préciser sa concentration et son temps de contact avec le sang.

II. Nous notons encore le parallélisme des courbes du chlore et du volume plasmatique, courbes grossièrement en sens inverse de celles du rapport chloré ; la notion sui-

GRAPHIQUE VI



Oxalate de K :

Variations en fonction de la concentration de l'anticoagulant.

I. —	Temps de contact:	0	heure.
II. —	—	2	—
III. —	—	3	—
IV. —	—	17	—
V. —	—	24	—

— { Courbe supérieure : Volume plasmatique.
 — { Courbe inférieure : volume globulaire.

- - - { Courbe supérieure : Chlore du plasma d'un litre de sang.
 - - - { Courbe inférieure : Chlore des globules d'un litre de sang.

++++ Rapport chloré globulo-plasmatique.

(Abscisses : Concentrations en g p. 1000.

(Ordonnées : Pourcentages de variations.

vante en résulte : les chlorures suivent l'eau dans le plasma non seulement en fonction de la concentration, mais aussi du temps de contact. Remarquons à nouveau le peu d'effet de la concentration de 1 p. 1000, les clochers à la première heure et la tendance à l'équilibre avant ou après 17 heures suivant la concentration.

III. Le chlore et l'eau globulaire varient ensemble, leurs variations inverses des variations correspondantes plasmatiques en constituent la vérification ; nous avons bien la preuve que tout ce qui entre dans le plasma sort des globules et réciproquement. La concordance satisfaisante des bilans pouvait d'ailleurs permettre de prévoir ce résultat.

En résumé, l'oxalate de sodium dans les conditions où nous l'avons étudié, provoque dans le sang les modifications suivantes :

I. Le plus souvent, un abaissement du rapport G/P, abaissement qui, aux divers temps de contact, n'est pas proportionnel à la quantité de l'anticoagulant.

II. Une sortie de chlore et d'eau des globules vers le plasma, sortie grossièrement proportionnelle à la concentration de l'oxalate.

III. Des variations souvent considérables (sauf pour la concentration de 1 p. 1000) du rapport chloré, du volume globulaire donc du volume plasmatique, du chlore des globules et du plasma d'un litre de sang suivant le temps de contact. Ceci indique que l'équilibre définitif n'est pas atteint immédiatement mais que le temps qu'il met à s'établir dépend de la concentration de l'anticoagulant.

Il est d'ailleurs à remarquer que, sauf pour la concentration de 1 p. 1000, l'équilibre initial, c'est-à-dire la va-

leur initiale du rapport $\frac{\text{ClG}}{\text{ClP}}$ du sang témoin n'est jamais

atteint. Nous aurons l'occasion de rapprocher ce fait des constatations faites lorsqu'on ajoute du ClNa au sang et même de généraliser cette notion, après avoir étudié les principaux anticoagulants et quelques électrolytes. Nous signalons donc dès maintenant comme premier résultat important: le déséquilibre créé dans le sang persiste malgré le temps, l'équilibre initial ne se retrouve pas (1).

III. OXALATE DE POTASSIUM

Le tableau IV, les graphiques VI et VII montrent la double influence de la concentration de l'anticoagulant et du temps de contact.

Plus la concentration est élevée et plus, en général, le rapport est abaissé, ce fait n'est pourtant pas absolument régulier et nos courbes montrent des oscillations assez im-

(1) En réalité, ce déséquilibre n'est qu'apparent; il est dû aux échanges d'eau provenant de l'hypertonie du plasma, consécutive à l'addition d'anticoagulant. Ces échanges aboutissent à la diminution du volume d'eau « osmotiquement utilisable » des hématies, c'est-à-dire eau utilisable par le chlorure de sodium pour sa dissolution. Cette eau « libre » peut être évaluée; et si on fait le calcul non du rapport $\frac{\text{ClG}}{\text{ClP}}$ mais du $\frac{\text{Cl eau totale des globules}}{\text{Cl eau totale du plasma}}$

on trouve au début et en fin d'expérience des rapports voisins qui deviennent même pratiquement identiques si on considère l'expression $\frac{\text{Cl dans l'eau « libre » des globules.}}{\text{Cl dans l'eau « libre » du plasma.}}$

L'évaluation de l'eau libre se fait par la différence Eau totale — Eau « liée », l'eau « liée » étant elle-même calculée d'après les travaux d'Adair et Robinson (76) et Sorensen (75), à partir des protéides sanguins ou, selon une méthode physico-chimique, que nous mettons actuellement au point et qui conduit à des résultats semblables (122).

TABLEAU IV

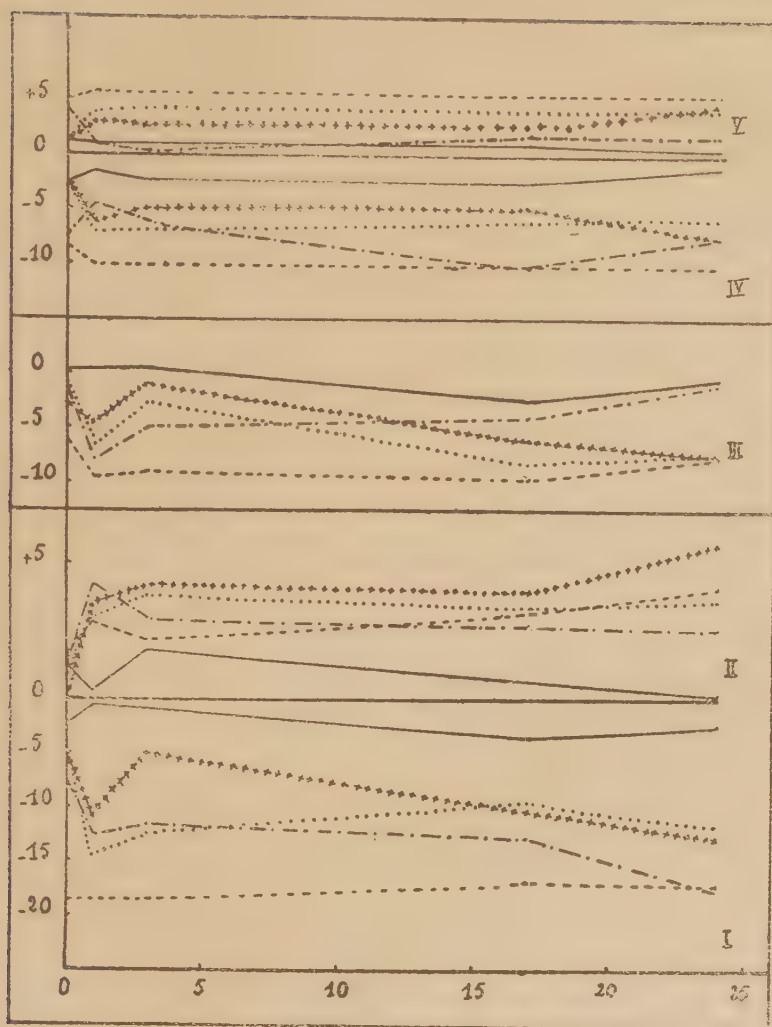
	Concentration de l'anticoagulant en g p. 1000	Temps de contact en heures				
		0	1	3	17	24
Cl G — Cl P	1	+ 0,3	+ 0,2	+ 0,5	— 2,3	— 0,5
	2	— 2,5	— 5,0	— 1,0	— 5,8	— 6,7
	3	— 1,6	— 8,0	— 5	— 4,1	— 0,7
	4	— 1,4	— 7,3	— 2,7	— 7,8	— 7,2
	5	— 6,7	— 9,6	— 8,8	— 9,2	— 8,3
V G	1	— 2,5	— 1,6	— 2,3	— 2,3	— 1,0
	2	— 2,3	— 6,2	— 5,0	— 4,5	— 7,3
	3	— 2,5	— 6,7	— 6,6	— 6,0	— 6,0
	4	— 7,3	— 4,6	— 6,0	— 10,0	— 7,3
	5	— 8,6	— 7,7	— 9,7	— 9,7	— 10,0
Cl G S	1	— 2,5	— 0,7	— 1,2	— 3,5	— 2,1
	2	— 6,0	— 10,8	— 5,0	— 9,3	— 12,6
	3	— 5,0	— 14,5	— 12,5	— 9,3	— 11,6
	4	— 7,7	— 12,5	— 11,5	— 12,6	— 17,0
	5	— 18,6	— 18,6	— 18,5	— 16,4	— 17,0
V P	1	+ 1,2	+ 0,9	+ 1,3	+ 1,3	+ 0,6
	2	+ 1,3	+ 3,1	+ 2,8	+ 2,5	+ 9,2
	3	+ 1,2	+ 3,6	+ 3,6	+ 2,8	+ 3,2
	4	+ 4,2	+ 1,0	+ 0,7	+ 2,9	+ 2,5
	5	+ 5,0	+ 5,8	+ 5,8	+ 5,8	+ 5,8
Cl P S	1	+ 1,7	+ 0,3	+ 1,9	+ 2,5	+ 0,2
	2	+ 1,2	+ 3,6	+ 4,2	+ 3,9	+ 5,7
	3	+ 0,6	+ 3,3	+ 3,8	+ 3,5	+ 3,7
	4	+ 0,1	+ 4,2	+ 3,0	+ 2,9	+ 2,8
	5	+ 1,2	+ 2,8	+ 2,3	+ 3,2	+ 4,3

RÉSULTATS CONCERNANT L'OXALATE DE POTASSIUM

portantes surtout pour les temps de contact de 3 heures et 24 heures. Ici encore, avec un temps de contact identique le même équilibre n'est pas atteint pour les différentes concentrations ; par conséquent, l'abaissement du rapport n'est pas proportionnel à la concentration de l'oxalate.

Ainsi donc l'oxalate de potassium abaisse le rapport chloré érythroplasmatique ; nous sommes d'accord avec

GRAPHIQUE VII



Oxalate de K :
Variations en fonction du temps de contact.

I. — Chlore des globules d'un litre de sang.	—	$C_2O_4Na_2$	1 p. 1000
II. — Chlore du plasma d'un litre de sang.	+++	—	2 —
III. — Rapport chloré globulo-plasmatique.		—	3 —
IV. — Volume globulaire.	---	—	4 —
V. — Volume plasmatique.	+-	—	5 —

Abscisses: temps en heures.

Ordonnées: Pourcentages de variation.

les auteurs antérieurs et même EISENMAN ayant trouvé trois fois une augmentation de ce rapport avec des concentrations 1,9, 2,0 et 3,3 p. 1000 (voir tableau I) se rapproche le plus de nos résultats (deux augmentations insignifiantes à la concentration de 1 p. 1000 pour des temps de contact de 0 et 3 heures.

Le graphique VI est en tous points comparable au graphique IV et permet également de constater des variations analogues de l'eau et du chlore plasmatique, respectivement inverses de celles de l'eau et du chlore globulaire elles-mêmes parallèles.

L'oxalate de potassium provoque donc une sortie d'eau et de chlore des globules, remarquons dès maintenant et bornons-nous pour l'instant à cette simple constatation, qu'à *poids égal* d'anticoagulant, les effets provoqués par l'oxalate de Na sont bien plus importants que ceux dus à l'oxalate de K.

L'influence du temps de contact reste saisissante et les constatations relatives au sel sodique sont encore vraies aussi bien en ce qui concerne le rapport lui-même que les termes de ce rapport.

L'oxalate de potassium provoque donc dans le sang sensiblement les mêmes perturbations que l'oxalate de sodium, le cation ne semble donc pas jouer de rôle prépondérant, les différences constatées étant dues à une autre cause que nous analyserons plus loin.

IV. FLUORURE DE SODIUM

D'une manière générale, cet anticoagulant, quelle que soit la concentration à laquelle on l'emploi produit :

1° Un abaissement du rapport chloré globulo-plasmatique ;

TABLEAU V

	Concentration de l'anticoagulant en g p. 1000	Temps de contact en heures				
		0	1	3	17	24
Cl G — Cl P	1	— 5	— 8,9	—18,8	— 5,0	+ 0,1
	2	—12	— 7,3	—10,0	— 4,1	— 5,0
	3	—15,2	—12,0	—12,0	— 5,7	— 5,0
	4	—11,2	—17,0	—10,3	—17,3	— 8,7
	5	—15,2	—18,2	—12,1	—15,2	—11,8
V G	1	— 5,7	— 5,7	— 5,7	— 5,7	—12,0
	2	— 8,2	— 9,5	—10,8	—15,8	—20,8
	3	—22,1	—14,5	—14,5	—20,1	—12,0
	4	—14,5	—15,8	—18,3	—14,5	—19,5
	5	—17,0	—23,3	—17,0	—13,3	—19,0
Cl G S	1	—10,5	—12,5	—21,7	—10,5	—11,1
	2	—18,4	—15,7	—17,7	—20,3	—25,0
	3	—33,5	—24,3	—25,6	—24,3	—16,4
	4	—24,3	—28,2	—27,6	—29,6	—28,2
	5	—31,1	—36,1	—28,2	—27,6	—28,9
V P	1	+ 3,8	+ 3,8	+ 3,8	+ 3,8	+ 7,9
	2	+ 5,4	+ 6,1	+ 7,1	+10,4	+13,7
	3	+14,6	+ 9,6	+ 9,6	+13,2	+ 7,9
	4	+ 9,6	+10,4	+12,1	+ 9,6	+12,9
	5	+11,2	+15,4	+11,2	+ 8,8	+12,6
Cl P S	1	+ 3,6	+ 6,3	+ 5,8	+ 3,6	+10,2
	2	+ 6,3	+ 7,0	+ 6,0	+ 9,2	+13,5
	3	+15,5	+12,8	+ 8,4	+13,1	+ 7,7
	4	+9,4	+13,5	+10,9	+ 9,4	+10,9
	5	+ 8,4	+17,4	+ 8,4	+ 7,0	+12,6

RÉSULTATS CONCERNANT LE FLUORURE DE SODIUM

2° Un abaissement de l'eau et du chlore globulaire.

3° Une augmentation de l'eau et du chlore plasmatique (voir graphique VIII et tableau V).

Le temps marque une tendance nette vers le retour à l'équilibre initial d'ailleurs jamais atteint, l'écart restant en général fonction de la concentration (graphique IX), l'abaissement du rapport atteint et dépasse 15 p. 100.

L'abaissement du chlore globulaire atteint jusqu'à 30 p. 100
L'abaissement du volume globulaire peut aller jusqu'à
20 p. 100. Ces variations sont plus importantes que celles
fournies par les oxalates.

Précisons ces données.

I. Influence de la concentration de l'anticoagulant
(Graphique VIII)

Cl G.
1° Rapport $\frac{\text{Cl G.}}{\text{Cl P}}$ Les courbes obtenues présentent une

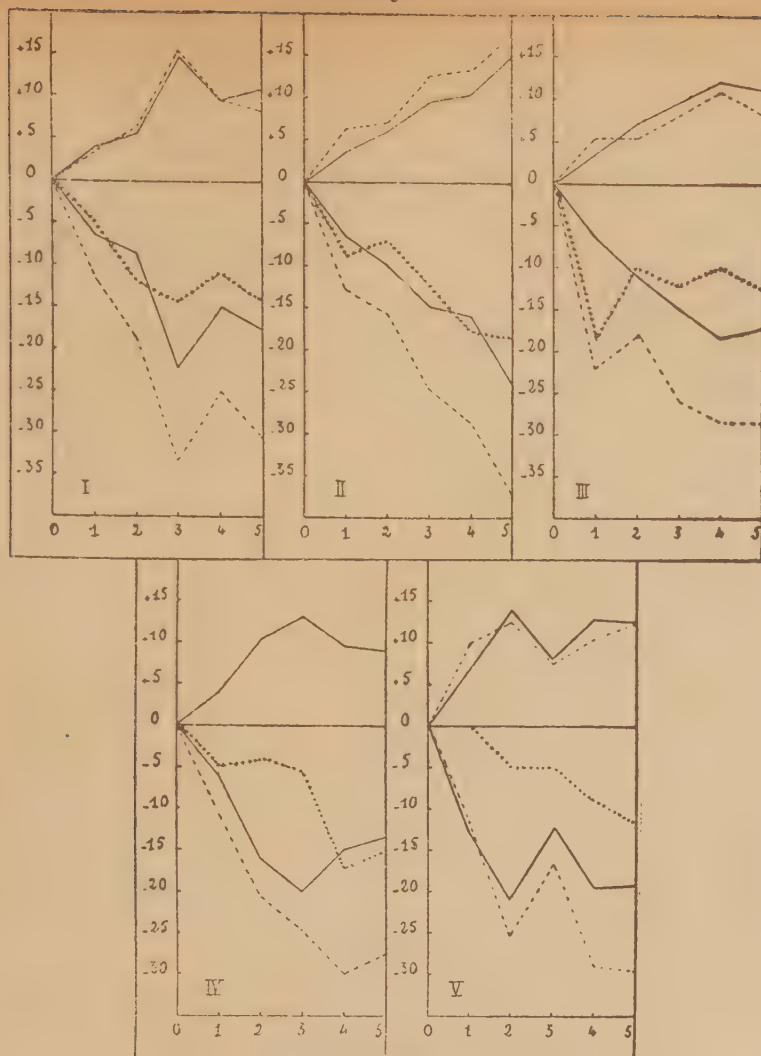
allure sensiblement comparable à celles des oxalates, mais
leur pente est plus forte.

Remarquons encore que la proportionnalité n'est pas
absolue entre la concentration de l'anticoagulant et l'effet
obtenu, quoique dans l'ensemble on puisse dire que les
deux faits dépendent l'un de l'autre.

2° Eau globulaire et eau plasmatique : Pour les temps
de contact de 1 heure et 3 heures, la concentration globu-
laire dépend en général de la concentration de l'anticoagu-
lant. Le phénomène est moins régulier pour des temps de
contact extrêmement courts (0 heure, c'est-à-dire pratique-
ment quelques minutes) ou suffisamment longs (17 à 24
heures) : les courbes présentent alors des clochers, en sens
inverse d'ailleurs, pour la concentration de 3 p. 1000. Bien
entendu, l'eau globulaire et l'eau plasmatique varient en
sens inverse.

3° Chlore globulaire et chlore plasmatique. Les varia-
tions suivent pratiquement celles de l'eau, l'écart augmen-
tant lorsque croît la concentration de l'anticoagulant.

GRAPHIQUE VIII



Fluorure de Na :

Variations en fonction de la concentration de l'anticoagulant.

I. — Temps de contact: 0 heure.

II. — — — 2 —

III. — — — 3 —

IV. — — — 17 —

V. — — — 24 —

- { Courbe supérieure : Volume plasmatique.
- { Courbe inférieure : volume globulaire.
- { Courbe supérieure : Chlore du plasma d'un litre de sang.
- { Courbe inférieure : Chlore des globules d'un litre de sang.
- ++++ Rapport chloré globulo-plasmatique.
- { Abscisses : Concentrations en g p. 1000.
- { Ordonnées : Pourcentages de variation.

II. *Influence du temps de contact* (Graphique IX)

1° Rapport G/P. Seul le fluorure sodique à 1 p. 1000 permet au bout de 24 heures de retrouver un rapport voisin du rapport initial.

D'une manière générale, l'augmentation du temps de contact atténue l'effet perturbateur qui reste toujours supérieur ou égal à 5 p. 100 lorsque la concentration en fluorure dépasse 1 p. 1000.

Notons que les effets sont plus ou moins irréguliers au début.

2° Eau globulaire et plasmatique. En général, le temps ne fait qu'augmenter la contraction globulaire. Les clochers du début de l'expérience correspondent sensiblement à ceux du rapport chloré, excepté toutefois pour la concentration de 1 p. 1000, nous verrons pourquoi.

3° Chlore globulaire et plasmatique. L'influence du temps de contact fait ressortir l'effet toujours plus net sur le volume que sur le chlore globulaire, on peut donc admettre que c'est la différence toujours au détriment du chlore qui règle la variation du rapport.

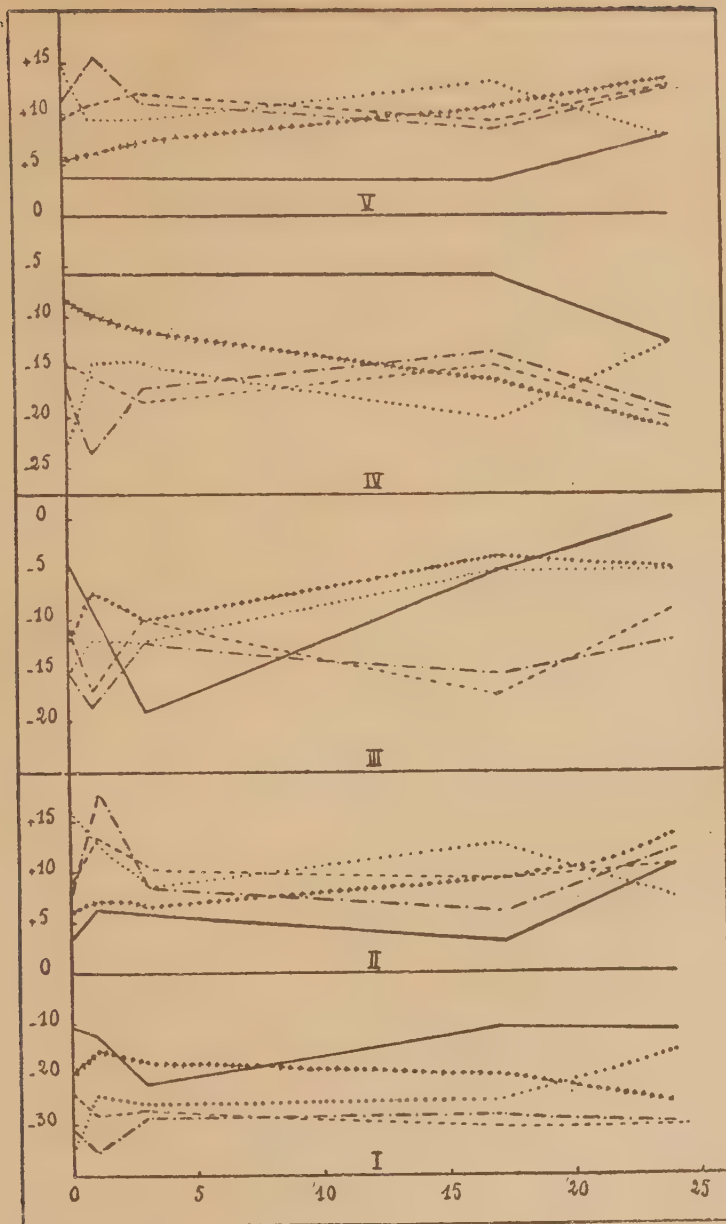
V. FLUORURE DE POTASSIUM

L'action du fluorure de potassium est moins puissante que celle du fluorure de sodium et nous notons que le rapport G/P, le chlore et le volume globulaire ne sont plus constamment abaissés (Tableau VI).

I. *Influence de la concentration de l'anticoagulant* (Graphique X)

Un point important est à signaler et à rapprocher d'un fait analogue précédemment noté: le rapport globulo-plas-

GRAPHIQUE IX



Fluorure de Na :

Variations en fonction du temps de contact.

- | | |
|--|-------------------|
| I. — Chlorure des globules d'un litre de sang. | —— FNa 1 p. 1000. |
| II. — Chlorure du plasma d'un litre de sang. | +++ — 2 — |
| III. — Rapport chloré globulo-plasmatisque. | — 3 — |
| IV. — Volume globulaire. | —+— — 4 — |
| V. — Volume plasmatique. | --- — 5 — |

Abscisses: Concentrations en g p. 1000.

Ordonnées: Pourcentages de variation.

matique et le chlore globulaire présentent au cours de leurs variations, un clocher correspondant à une augmentation pour un temps de contact extrêmement bref (0 à quelques minutes) ou suffisamment long (17-24 heures).

L'abaissement est sensiblement régulier et proportionnel à la concentration de l'anticoagulant pour le temps de contact de 1 et 3 heures.

Ici encore, l'écart entre les variations du chlore et du volume globulaire augmente avec la concentration de l'anticoagulant.

Les valeurs du chlore plasmatique vérifient celles du chlore globulaire; il convient au surplus de signaler à ce propos la quasi-symétrie par rapport à la valeur du sang témoin des courbes de variations plasmatiques et globulaires.

II. *Influence du temps de contact* (Graphique XI)

1° Les courbes concernant le rapport chloré sont typiques et mettent en évidence les faits suivants :

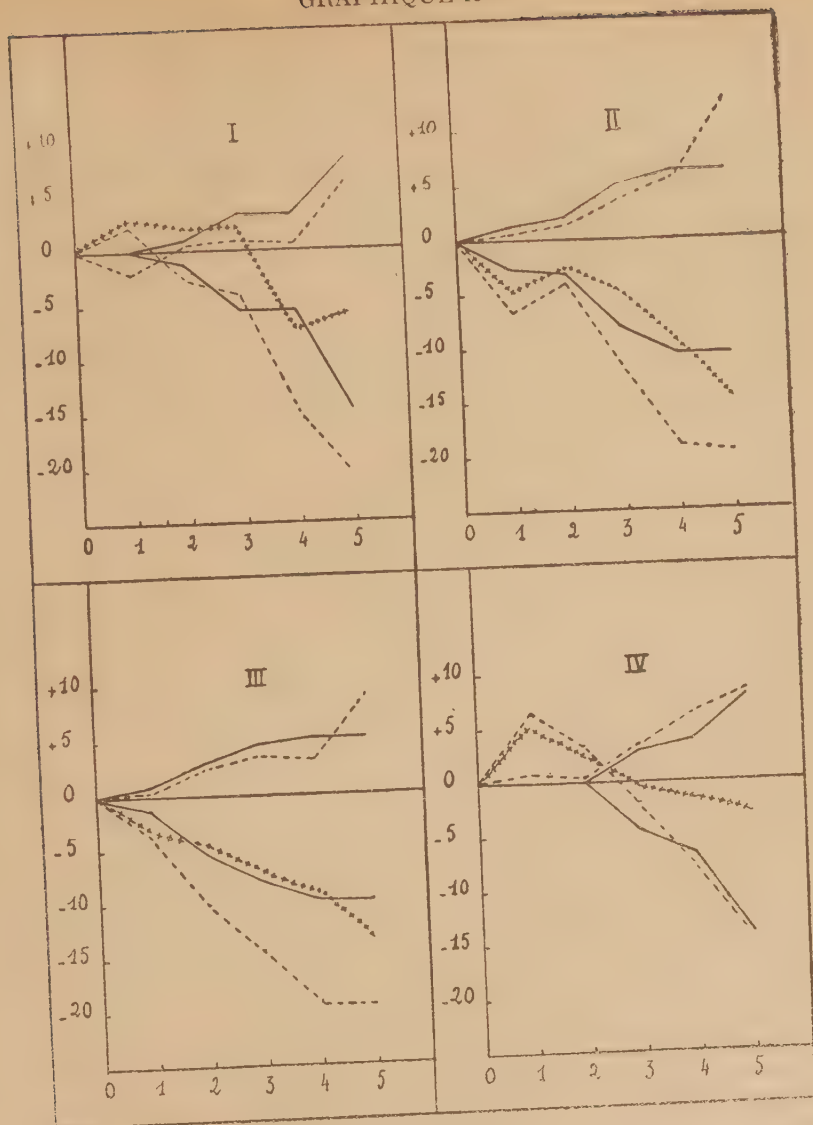
a) Le rapport G/P supérieur à la normale au début de l'expérience pour les concentrations de 1, 2 et 3 p. 1000, baisse jusqu'aux environs de 5 p. 100 après 1 à 3 heures de contact, puis remonte jusqu'à atteindre une valeur sensiblement normale.

b) Pour les concentrations 4 et 5 p. 1000, le rapport est inférieur à la normale dès le début de l'expérience, baisse jusqu'à — 10 — 15 p. 100 puis remonte jusqu'aux environs de — 5 p. 100.

c) Les courbes III du graphique XI, pratiquement parallèles, sont placées les unes par rapport aux autres dans l'ordre des concentrations croissantes 1-2-3-4-5 p. 1000.

2° Les variations du chlore globulaire suivent très sensiblement celles du rapport avec une pente plus grande;

GRAPHIQUE X



Fluorure de K :

Influence de la concentration de l'anticoagulant.

- I. — Temps de contact: 0 heure.
 II. — — 2 —
 III. — — 3 —
 IV. — — 17 —

— { Courbe supérieure: Volume plasmatique.
 — { Courbe inférieure: volume globulaire.
 - - - - { Courbe supérieure: Chlore du plasma d'un litre de sang.
 - - - - { Courbe inférieure: Chlore des globules d'un litre de sang.
 ++++ { Rapport chloré globulo-plasmatique.
 { Abscisses: Concentrations en g p. 1000.
 { Ordonnées: Pourcentages de variation.

TABLEAU VI

	Concentration de l'anticoagulant en g p. 1000	Temps de contact en heures				
		0	1	3	17	24
Cl G — Cl P	1	+ 2,6	— 4,5	— 3,2	+ 5	—
	2	+ 1,9	— 3,0	— 4,5	+ 2,6	—
	3	+ 2,6	— 4,0	— 6,8	— 0,6	—
	4	— 7,3	— 9,5	— 8,9	— 1,6	—
	5	— 6,0	— 14,4	— 13,4	+ 2,9	— 2,9
V G	1	0	— 2,6	— 1,3	0	—
	2	— 1,3	— 3,0	— 5,3	0	—
	3	— 5,3	— 8,0	— 8,0	— 4,0	—
	4	— 5,3	— 10,6	— 9,6	— 6,6	—
	5	— 14,6	— 10,6	— 9,4	— 13,3	— 10,6
Cl G S	1	+ 1,9	— 6,4	— 3,8	+ 6,4	—
	2	— 2,5	— 3,8	— 9,6	+ 3,2	—
	3	— 3,8	— 11,6	— 14,1	— 1,9	—
	4	— 14,1	— 18,7	— 18,7	— 7,0	—
	5	— 20,6	— 19,3	— 18,7	— 14,1	— 11,6
V P	1	0	+ 1,6	+ 0,8	0	—
	2	+ 0,8	+ 2,0	+ 3,2	0	—
	3	+ 3,2	+ 4,8	+ 4,8	+ 2,9	—
	4	+ 3,2	+ 6,4	+ 5,6	+ 4,0	—
	5	+ 8,8	+ 6,4	+ 5,6	+ 8,0	+ 6,4
Cl P S	1	— 1,8	+ 1,1	+ 0,4	+ 1,1	—
	2	+ 0,4	+ 1,8	+ 2,8	+ 0,7	—
	3	+ 1,1	+ 4,4	+ 3,7	+ 3,7	—
	4	+ 0,7	+ 6,1	+ 3,5	+ 6,3	—
	5	+ 6,5	+ 13,4	+ 8,9	+ 8,4	+ 6,8

RÉSULTATS CONCERNANT LE FLUORURE DE POTASSIUM

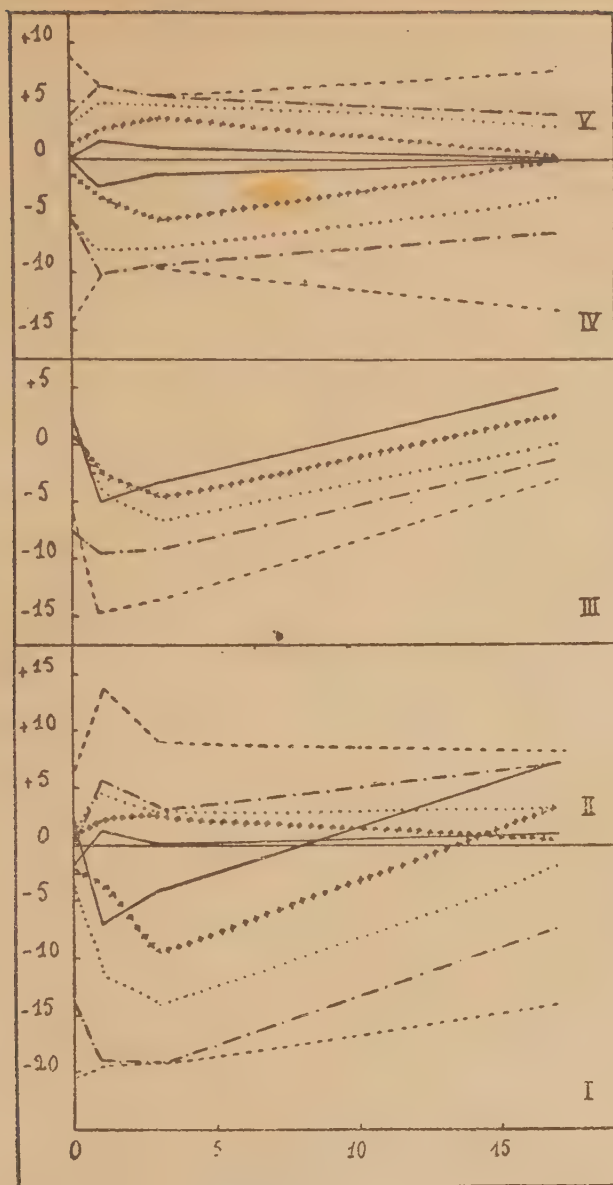
celles du volume globulaire montrent le même parallélisme avec une pente plus faible.

3° Les courbes plasmatiques, toujours inverses des courbes globulaires en constituent la vérification.

VI. CITRATE TRISODIQUE ET LIQUOIDE

Nous avons jugé bon de grouper les résultats concernant ces deux anticoagulants par suite de la profonde ana-

GRAPHIQUE XI



Fluorure de K :
Influence du temps de contact.

- | | |
|--|------------------|
| I. — Chlore des globules d'un litre de sang. | —— FK 1 p. 1000. |
| II. — Chlore du plasma d'un litre de sang. | +++ — 2 — |
| III. — Rapport chloré globulo-plasmatique. | — 3 — |
| IV. — Volume globulaire. | --- — 4 — |
| V. — Volume plasmatique. | ---- — 5 — |

Abscisses: Concentrations en g p. 1000.

Ordonnées: Pourcentages de variations.

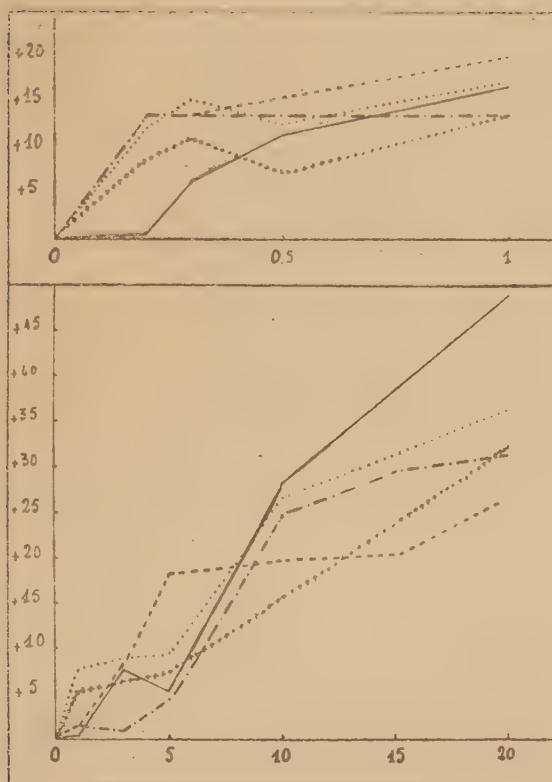
TABLEAU VII

Nature de l'anticoagulant		Concentra- tion de l'an- ticoagulant en g p. 1000	Temps de contact en heures				
			0	1	3	17	24
Citrate Trisodique	Cl G — Cl P	1	+ 0,5	+ 5,4	+ 7,4	+ 1,8	+ 2,3
		3	+ 6,9	+ 6,4	+ 8,3	+ 1,0	+ 8,4
		5	+ 5,4	+ 7,6	+ 9,2	+ 4,5	+ 18,2
		10	+ 27,4	+ 15,8	+ 26,2	+ 15,1	+ 20,0
		15	+ 41,0	+ 24,5	+ 31,8	+ 29,4	+ 21,0
		20	+ 48,8	+ 32,5	+ 36,3	+ 31,8	+ 26,9
	V G	1	— 6,5	— 5,0	— 0,8	+ 1,9	+ 6,2
		3	— 4,8	— 9,3	— 2,2	— 1,5	+ 2,8
		5	— 9,3	— 9,3	— 10,7	— 7,9	— 5,0
		10	— 15,6	— 8,7	— 10,5	— 1,2	— 12,5
		15	— 20,0	— 16,2	— 11,2	— 18,0	— 17,8
		20	— 15,0	—	— 23,7	— 16,2	— 25,0
	Cl G S	1	— 7,2	0	+ 7,2	— 2,9	+ 8,7
		3	+ 10,2	+ 5,1	0	— 9,5	+ 5,8
		5	+ 5,1	+ 5,8	— 2,1	— 2,9	+ 5,8
		10	+ 2,5	+ 0,6	— 5,6	+ 14,4	0
		15	+ 3,1	+ 4,4	— 2,5	+ 9,4	+ 3,1
		20	+ 9,4	—	— 1,2	+ 8,8	+ 11,9
Liquoïde	Cl G — Cl P	0,2	+ 0,4	+ 9,2	+ 12,4	+ 13,6	+ 13,6
		0,3	+ 6,5	+ 11,4	+ 15,3	+ 13,6	+ 13,6
		0,5	+ 11,4	+ 7,4	+ 13,6	+ 13,6	+ 15,2
		1	+ 17,3	+ 13,0	+ 17,3	+ 13,6	+ 20,3
	V G	0,2	0	0	0	+ 2,8	+ 2,8
		0,3	0	+ 1,5	+ 2,8	+ 5,7	—
		0,5	+ 1,5	0	+ 2,8	+ 4,3	+ 1,3
		1	+ 1,5	—	+ 2,8	+ 1,5	0
	Cl G S	0,2	+ 0,1	+ 8,2	+ 12,4	+ 12,5	+ 10,5
		0,3	— 0,2	+ 10,5	+ 12,4	+ 15,2	—
		0,5	+ 10,5	+ 6,2	+ 16,2	+ 18,1	+ 11,1
		1	+ 14,2	—	+ 15,4	+ 14,5	+ 14,2

RÉSULTATS CONCERNANT LE CITRATE TRISODIQUE ET LE LIQUOÏDE

logie due, du moins en partie, comme nous le verrons, à la grosseur de leurs molécules; nous avons tenu à faire ainsi mieux ressortir un fait fondamental: alors que les anticoagulants jusqu'ici envisagés abaissent le rapport globulo-plasmaticque, le chlore et le volume globulaire, le citrate trisodique et le polyanethol-disulfonate de sodium augmentent constamment ces trois grandeurs (tableau VII).

GRAPHIQUE XII



Liquoïde et Citrate trisodique:
Influence de la concentration de l'anticoagulant.

Le graphique supérieur concerne le liquoïde.

Le graphique inférieur concerne le citrate trisodique.

—	Temps de contact :	0	heure.
+++	—	1	—
.....	—	3	—
-.-	—	17	—
----	—	24	—

{ Abscisses: Concentrations en g p. 1000.
{ Ordonnées: Pourcentage de variations.

I. — *Influence de la concentration de l'anticoagulant*

(Graphique XII)

L'effet de l'anticoagulant dépend de sa concentration; les courbes du graphique XII le montrent avec netteté.

Le citrate trisodique, en particulier, peut augmenter le rapport G/P jusqu'à 50 p. 100 de sa valeur.

D'une manière générale:

1°. Dans tous les cas, c'est pour la plus forte concentration utilisée (20 p. 1000 pour le citrate, 1 p. 1000 pour le liquoïde) que sont obtenus les écarts maxima du rapport chloré avec sa valeur normale.

2°. A cette augmentation pratiquement régulière du rapport correspondent:

a). Un abaissement régulier du volume globulaire et une augmentation moins importante du chlore globulaire avec le citrate trisodique.

b). De très faibles variations du volume et une augmentation relativement plus importante du chlore globulaire avec le liquoïde.

3°. Nous n'avons pas indiqué, pour abréger, les résultats plasmatiques qui, comme nous l'avons vu jusqu'à maintenant, confirment les chiffres globulaires.

II. — *Influence du temps de contact*

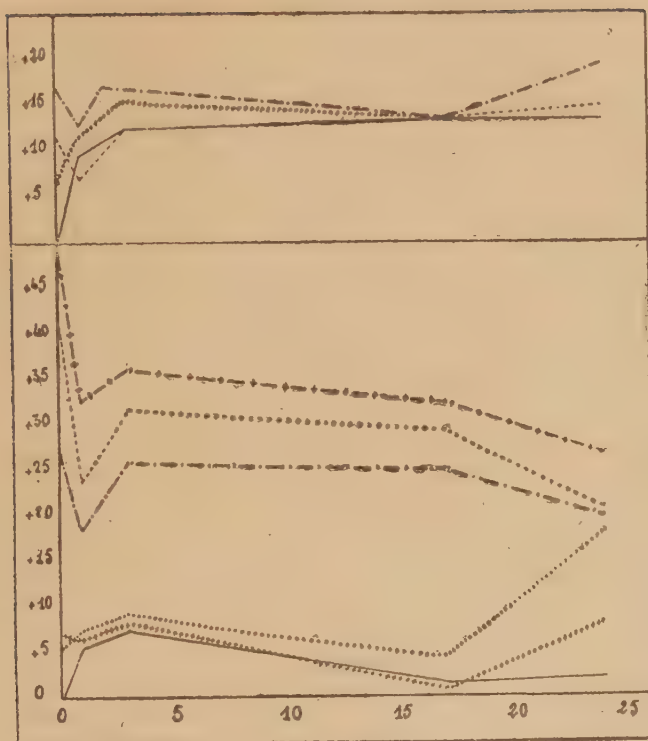
(Graphique XIII)

Considérons séparément citrate et liquoïde.

1°. Citrate trisodique: deux groupes de faits:

a). Pour les concentrations de 10, 15, 20 p. 1000, l'écart maximum est réalisé au début de l'expérience, au moment de l'établissement brusque du déséquilibre.

GRAPHIQUE XIII



Liquoïde et Citrate trisodique:
Influence du temps de contact.

Variation du rapport globulo-plasmatique
en fonction du temps de contact.

- { Courbe supérieure: Liquoïde à 0,2 p. 1000.
- { Courbe inférieure: Citrate trisodique à 1 p. 1000.
- ++++ { Courbe supérieure: Liquoïde à 0,3 p. 1000.
- ++++ { Courbe inférieure: Citrate trisodique à 2 p. 1000.
- Citrate trisodique: 5 p. 1000.
- - - { Courbe supérieure: Liquoïde 1 p. 1000.
- - - { Courbe inférieure: Citrate trisodique 10 p. 1000.
- - - { Courbe supérieure: Liquoïde 0,5 p. 1000.
- - - { Courbe inférieure: Citrate trisodique 15 p. 1000.
- + - + - + Citrate trisodique 20 p. 1000

{ Abscisses: Temps de contact en heures.
{ Ordonnées: Pourcentages de variation.

b) Pour les concentrations de 1, 3, 5 p. 1000, c'est au contraire en fin d'expérience, que le rapport G/P s'écarte le plus de sa valeur initiale.

2°/. Liquoïde: si la fin de l'expérience nous met en présence d'un résultat constant: écart maximum du rapport, écart d'ailleurs en général proportionnel à la concentration de l'anticoagulant, le début nous montre le même phénomène qu'avec le citrate. C'est dire que pour un temps de contact nul (pratiquement quelques minutes), on observe un écart relativement important (10-15 p. 100), puis une diminution aux concentrations de 0,5 et 1 p. 1000 et une variation régulièrement croissante pour les concentrations de 0,2 et 0,3 p. 1000. Le rapprochement des deux groupes de courbes du graphique XIII est d'ailleurs particulièrement instructif. Comparer notamment les concentrations 1, 3, 5 p. 1000 de citrate et 0,2, 0,3 p. 1000 de liquoïde d'une part, et 10, 15, 20 p. 1000 de citrate et 0,5, 1 p. 1000 de liquoïde d'autre part.

Les résultats que nous venons d'exposer précisent l'importance d'au moins deux facteurs dans l'action des anticoagulants sur l'équilibre minéral sanguin et en particulier sur le rapport globulo-plasmatique du chlore: la concentration de l'anticoagulant et son temps de contact avec le sang.

Nous nous bornons, pour l'instant, à la simple constatation des faits, réservant pour un prochain chapitre l'interprétation qu'ils suggèrent.

Mais quelques données doivent encore être précisées pour nous fournir tous les éléments de discussion.

VII. — INFLUENCE DE L'ÉTAT PHYSIQUE DE L'ANTICOAGULANT

Dans toutes les expériences ci-dessus, l'anticoagulant était ajouté au sang en cristaux finement pulvérisés; dans

TABLEAU VIII
INFLUENCE DE L'ÉTAT PHYSIQUE DE L'ANTICOAGULANT

Nature de l'anti- coagulant	Concen- tration de l'anti- coagulant 0/00	Temps de contact en heures											
		0			1			3			17		
		S	L	S	S	L	S	S	L	S	L	S	L
C ₂ O ₄ Na ₂	1	+ 1,3	-12,3	- 3,0	-14,5	+ 0,5	-16,0	+ 1,3	-15,2	- 0,3	-14,2	- 0,3	-14,2
	2	- 7,1	-10,5	- 7,1	-20,2	- 2,0	-19,5	- 2,0	-21,7	- 3,0	-12,0	- 3,0	-12,0
	3	- 7,1	- 9,4	- 9,0	-18,4	- 9,6	-26,5	- 8,0	-25,3	- 4,7	- 8,7	- 4,7	- 8,7
FNa	1	- 5,0	-21,1	- 8,9	-21,3	-18,8	-13,4	- 5,0	-13,1	+ 0,1	-20,3	+ 0,1	-20,3
	2	-12,0	-21,1	- 7,3	-21,0	- 0,0	-20,5	- 4,1	-19,5	- 5,0	-16,6	- 5,0	-16,6
	3	-15,2	-19,8	-12,0	-25,5	-12,0	-23,1	- 5,7	-21,7	- 5,0	-18,2	- 5,0	-18,2
FK	1	+ 2,6	-	- 4,5	- 5,9	- 3,2	-	+ 5,0	-	-	-	-	-
	2	+ 1,9	-	- 3,0	-10,5	- 4,5	-	+ 2,6	-	-	-	-	-
	4	- 7,3	-	- 9,5	-21,8	- 8,9	-	- 1,6	-	-	-	-	-
Citrate Trisodique	1	+ 0,5	- 7,7	+ 5,4	-10,1	+ 7,4	- 5,7	+ 1,8	- 6,6	+ 2,3	- 3,7	+ 2,3	- 3,7
	2	+ 0,6	- 6,6	+ 5,4	- 7,8	+ 5,4	- 7,4	+ 0,5	- 5,9	+ 6,4	+ 2,2	+ 6,4	+ 2,2
	3	+ 6,9	-12,7	+ 6,4	- 1,1	+ 8,3	- 4,1	+ 1,0	- 1,2	+ 8,4	+ 0,3	+ 8,4	+ 0,3
	4	+ 9,2	- 6,1	+ 6,9	-55,7	+ 5,0	- 2,5	+ 3,2	- 7,2	+ 13,5	+ 9,6	+ 13,5	+ 9,6
	5	+ 5,4	- 1,7	+ 7,6	-11,7	+ 9,7	+ 3,7	+ 4,5	- 3,7	+ 18,2	+ 3,7	+ 18,2	+ 3,7
	10	+41,0	-	+24,5	+ 2,5	+26,2	-	+25,2	-	+20,0	-	+20,0	-
	15	+27,4	-	+15,3	+ 8,9	+31,8	-	+29,4	-	+21,0	-	+21,0	-

S = Anticoagulant introduit à l'état solide.
L = Anticoagulant introduit sous forme de liquide.

une autre série de recherches, nous avons introduit dans le sang des solutions aqueuses des mêmes anticoagulants, de façon que leurs concentrations dans le sang soient identiques.

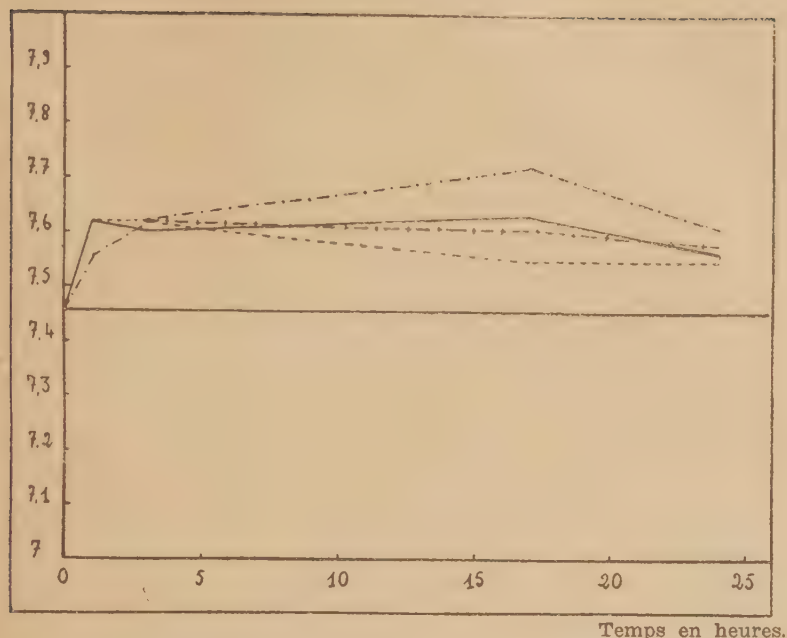
Quelle que soit cette concentration, dans le cas de l'anticoagulant solide, elle réalise une hypertonicité plasmatique avec toutes ses conséquences. S'il s'agit, au contraire, de solution d'anticoagulant, le problème est de savoir si celle-ci est hypo, iso ou hypertonique par rapport au sang. Quoiqu'il en soit, la tonicité du plasma anticoagulé par une solution est moindre que celle du même plasma ayant reçu l'anticoagulant en poudre; par suite, dans le premier cas, la concentration des constituants plasmatiques est nécessairement plus faible; ceci est vrai en particulier pour le chlorure de sodium, l'abaissement du rapport G/P devrait donc être plus faible avec les oxalates et les fluorures, son augmentation plus importante avec le citrate et le liquoïde. En fait, quelques chiffres groupés dans le tableau VIII attestent exactement le contraire ce qui peut, *a priori*, paraître paradoxal et, en réalité, s'explique aisément. Il est naturellement instructif de confronter ces données avec les résultats concernant les variations du volume globulaire; nous aurons l'occasion d'y revenir.

VIII. — INFLUENCE DE L'ACIDITÉ DU MILIEU ET DE L'ANTICOAGULANT

On a longuement insisté, au cours des travaux antérieurs, sur l'importance du système $\text{CO}_3\text{H}^- - \text{Na}^+ - \text{Cl}^-$, c'est-à-dire, en somme sur la réaction schématique:



GRAPHIQUE XIV



Variations du pH en fonction du temps de contact.

entre le système chlorures — bicarbonates et on admet classiquement que le départ du CO_2 sanguin sous une influence quelconque produit de ce fait des modifications de l'équilibre chloré, ce qui revient à dire que l'alcalinisation du sang déterminerait des variations du rapport globulo-plasmaticque du chlore, d'où trois problèmes que nous nous sommes posés.

I/. Dans quel sens les anticoagulants modifient le pH du sérum?

II/. Quelle relation existe-t-il entre ce pH et le rapport $\frac{\text{Cl G}}{\text{Cl P}}$?

III/. Est-il possible de créer expérimentalement une modification du pH, de façon à confirmer cette relation?

I. — La première de ces questions est résolue simplement par l'étude du pH , étude qui doit toujours être faite très rapidement et qui permet de constater que l'alcalinité du sérum augmente dès le début de l'expérience plus ou moins régulièrement et sans relation nette avec la concentration de l'anticoagulant, ce qui ne saurait nous surprendre puisqu'il s'agit de variations de concentrations trop faibles pour influencer de façon significative la concentration en ions H^+ . Cette augmentation du pH se poursuit plus ou moins longtemps, selon l'anticoagulant, puis s'atténue, et il n'est pas rare de retrouver en fin d'expérience (après 24 heures de contact) un pH comparable, sinon identique au pH initial, compte tenu de l'alcalinisation inévitable du sérum normal témoin, ce qui revient à dire que nous trouvons toujours après un temps de contact suffisant un pH supérieur au pH normal mais toujours inférieur à la valeur maxima observée en cours d'expérience.

Le graphique XIV présente quelques-unes des plus typiques des courbes de variation du pH en fonction du temps de contact de l'oxalate de potassium; l'effet est d'ailleurs, avec cet anticoagulant, plus net qu'avec le sel sodique.

II. — Le rapprochement de ces courbes avec les courbes III du graphique VII montre que l'augmentation du pH correspond en général à une diminution du rapport globulo-plasmatisque, c'est-à-dire pratiquement à une diminution du Cl G S (Chlore des globules d'un litre de sang) et à une augmentation du Cl P S (Chlore du plasma d'un litre de sang). Ces résultats confirment les expériences *in vitro* de HAMBURGER, de DAUTREBANDE et DAVIES [123], les recherches cliniques de BOULANGER et DRIESSENS ([123], CHABANIER, LOBO, O'NEILL et E. LELU [84]. D'après ces tra-

vaux, l'acidose provoquerait une surcharge des globules en chlore (plus exactement en ClH). Renversant les propositions, AMBARD [125] admet que l'augmentation de ce rapport est le témoin de la présence d'ions acides.

Quel que soit l'intérêt des conceptions d'AMBARD, vraisemblablement trop formelles, nous ne saurions oublier que de nombreux faits cliniques leur apportent des objections (BÉNARD, LENORMAND et MERKLEN [126], RATHERY et RUDOLF [127, 128, 129]). Sans préjuger du mécanisme invoqué, il y a un rapport inverse entre la chloration de l'organisme et la réserve alcaline (AMBARD, ADNOT et SCHMIDT [130]). Un autre fait est non moins constant dans nos expériences: relation inverse entre le rapport Cl G/Cl P et le pH plasmatique. Or, la diminution du rapport chloré implique, comme nous le verrons, la substitution partielle de l'ion anticoagulant à l'ion chlore dans les globules, c'est-à-dire une diminution de la teneur du sérum en anticoagulant correspondant à une tendance à l'alcalinisation. On pourrait penser que le pH influe sur le rapport G/P , non seulement en provoquant éventuellement des échanges chlorés, mais indirectement par action sur le volume globulaire. Il n'en est rien et les travaux de HAMPSON et MAIZELS [115], ont montré que ces variations sont effectivement très faibles entre les pH 7 et 8, limites jamais dépassées et d'autant plus faibles que la solution qui baigne les globules rouges a une tonicité plus grande.

III. — La comparaison de l'effet de l'oxalate neutre et de l'oxalate acide de sodium. d'une part, du fluorure neutre et du fluorure acide de sodium. d'autre part, permet de noter que:

a) Le pH du sérum est déplacé vers l'acidité avec les sels acides, ce qui ne saurait nous surprendre.

TABLEAU IX

Nature de l'anti- coagulant	Concentration de l'anticoagu- lant p. 1000	Temps de contact en heures											
		0			1			3			17		
		A	N	N	A	N	N	A	N	N	A	N	N
Oxalate de Na	1	+31,9	+ 1,3	— 3,0	+31,4	— 3,0	— 3,0	+23,3	+ 0,5	+23,5	+ 1,3	+37,2	— 0,3
	2	+24,0	— 7,1	— 7,1	+21,6	— 7,1	— 7,1	+15,6	— 2,0	+27,0	— 2,0	+25,2	— 3,0
	3	+13,0	— 7,1	— 9,0	+13,5	— 9,0	— 9,0	+21,4	— 9,6	+23,1	— 8,0	+28,1	— 4,7
	4	+10,8	— 4,7	— 7,7	+16,8	— 7,7	— 7,7	+14,0	— 5,8	+ 8,4	— 1,7	+ 6,7	— 2,0
	5	+ 9,5	— 3,7	— 6,0	+ 9,4	— 6,0	— 6,0	+19,6	— 6,0	+ 9,0	— 6,0	+ 6,0	— 6,0
Fluorure de Na	1	+23,2	— 5,0	— 8,9	+15,3	— 8,9	— 8,9	+27,2	—18,8	+33,3	— 5,0	+35,5	+ 0,1
	2	+39,7	—12,0	— 7,3	+44,5	— 7,3	— 7,3	+41,1	—10,0	+34,8	— 4,1	+49,4	— 5,0
	3	+31,8	—15,2	—12,0	+48,3	—12,0	—12,0	+46,6	—12,0	+41,5	— 5,7	+37,5	— 5,0
	4	+45,8	—11,1	—17,0	+39,0	—17,0	—17,0	+35,6	—10,3	—	—17,3	+51,0	— 8,7
	5	+45,8	—15,1	—18,2	—	—18,2	—18,2	—	—12,1	+42,8	—15,2	+49,4	—11,8

A = Sel acide.

N = Sel neutre.

b) Le rapport chloré est toujours très augmenté, en particulier avec le bifluorure, alors qu'il est constamment abaissé avec les sels neutres; nous indiquons quelques chiffres justificatifs (tableau IX).

Il y a donc là une confirmation de ce que nous venons de rapporter ci-dessus: variation en sens inverse du pH et du rapport G/P. Toutefois, et quoique cette relation soit particulièrement nette, elle est insuffisante pour expliquer les différences énormes constatées notamment entre l'effet du fluorure neutre et celui du fluorure acide de sodium. Force nous est d'admettre l'intervention de facteurs inhérents au corps lui-même, c'est-à-dire à la nature de l'ion anticoagulant qui, toutes données physico-chimiques (pH , poids moléculaire, concentration moléculaire...) étant égales par ailleurs, agit différemment. Il nous reste à dire un mot des faits constatés à ce dernier point de vue.

IX. — INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ANTICOAGULANT

Considérons les cinq anticoagulants:

Oxalate de sodium $C_2O_4Na_2$;

Oxalate de potassium $C_2O_4K_2$, H_2O ;

Fluorure de sodium FNa ;

Fluorure de potassium FK ;

Citrate trisodique $(C_6H_5O_7Na_3)_2$, 11 H_2O ,

leurs poids moléculaires différent, leurs constantes de dissociation aussi, on ne peut donc connaître l'effet osmotique dû à une concentration moléculaire déterminée qu'au moyen d'une série de mesures cryoscopiques, comme nous l'avons indiqué sur le graphique I. Considérons, par exemple, le point de la courbe cryoscopique du citrate trisodique correspondant à une concentration de 5 p. 1000, déterminé

en menant par le point d'abscisse 5 une parallèle à l'axe des ordonnées. Par le point d'intersection avec la courbe du citrate, menons une parallèle à l'axe des abscisses, elle coupe successivement les courbes de l'oxalate de potassium, de l'oxalate de sodium, du fluorure de potassium, du fluorure de sodium. Par les points d'intersection obtenus, nous menons des parallèles à l'axe des ordonnées; celles-ci coupent l'axe des abscisses en des points d'abscisse 2, 2,3, 2,7, 3,6. Il en résulte qu'osmotiquement parlant, on peut, en première approximation, considérer comme équivalents:

- Le citrate trisodique à 5 p. 1000;
- L'oxalate de potassium à 3,6 p. 1000;
- L'oxalate de sodium à 8,7 p. 1000.
- Le fluorure de potassium à 2,3 p. 1000;
- Le fluorure de sodium à 2 p. 1000.

Considérons l'effet sur le rapport globulo-plasmatique de ces anticoagulants à des concentrations pour les trois temps de contact de 0, 3 et 24 heures correspondant au début, à l'étape intermédiaire et, à la fin de l'expérience, on obtient les chiffres ci-dessous calculés par intrapolation, en admettant comme légitime de considérer la variation du rapport comme linéaire entre deux concentrations voisines.

TABEAU X

Nature de l'anticoagulant	Temps de contact en heures		
	0	3	24
$C_2O_4Na_2$ à 2,7 p. 1000	— 7,1	— 4,5	— 3,6
$C_2O_4K_2$ à 3,6 p. 1000	— 1,5	— 3,9	— 3,7
FNa à 2 p. 1000	— 1,2	— 10	— 5,0
FK à 2,3 p. 1000	+ 2,1	— 5,1	—
$C_6H_5O_7Na_3$ à 5 p. 1000	+ 5,4	+ 9,2	+ 18,2

Il en ressort que seuls, l'oxalate de sodium et de potassium ont des effets comparables, et encore seulement au bout d'un temps suffisant.

Il est très aisé de multiplier de telles configurations qui nous mettent en présence de cette notion, en somme assez mystérieuse, d'effet propre d'un ion sur la membrane globulaire, effet qui peut être d'ailleurs influencé par le cation auquel est combiné l'anion anticoagulant. Il ne s'agit, ni plus ni moins, que de la perméabilité sélective des hématies, phénomène, à proprement parler biologique, en rapport non seulement avec l'état statique du sang, mais surtout avec les transformations métaboliques dont il est le siège constant.

CHAPITRE V

EFFETS GENERAUX DES ANTICOAGULANTS

Les observations faites au cours des pages précédentes se présentent schématiquement de la façon suivante:

I. — ACTION DILUANTE DES ANTICOAGULANTS

Les anticoagulants que nous avons étudiés abaissent le volume globulaire (VG), à l'exception du liquoïde qui ne produit que peu de modifications se traduisant toujours par une légère augmentation.

Cet abaissement de volume globulaire est fonction de la concentration de l'anticoagulant et du temps de contact avec le sang. Mais, tandis qu'il y a en général proportionnalité (plus ou moins précise d'ailleurs) entre cette diminution et la concentration de l'anticoagulant, la loi qui relie celle-là au temps de contact est moins simple, et il y a en général lieu de distinguer:

1°) Les variations initiales, c'est-à-dire se produisant au cours de la première heure;

2°) L'établissement progressif de l'équilibre final toujours différent de l'équilibre initial.

3°) La nature de cet équilibre final.

L'effet du facteur temps dépend d'ailleurs lui-même de la concentration de l'anticoagulant.

En général, après les inévitables perturbations brutales du début, dont nous aurons à rechercher les causes, le volu-

me globulaire tend lentement à se relever, sans jamais retrouver sa valeur initiale, à l'exception, toutefois, du fluorure de sodium, pour lequel c'est au bout de 24 heures qu'est atteint le plus souvent la valeur minima du volume globulaire.

L'abaissement du volume globulaire apparaît donc comme une conséquence constante de l'introduction dans le sang des anticoagulants; il correspond à une concentration des globules, c'est-à-dire à une diminution de leur teneur en eau, diminution d'ailleurs difficile à mettre en évidence, selon BLITSTEIN, par le dosage de l'extrait sec. Le résultat de cette contraction globulaire est une dilution plasmatique qui, naturellement, retentit sur la concentration des éléments sanguins.

D'après leur action diluante, les anticoagulants peuvent être classés à la suite de nos recherches, en indiquant les valeurs moyennes de la variation globulaire p. 100 correspondant aux différentes concentrations, pour un temps de contact moyen.

Désignons par ΔV la variation du volume globulaire p. 100, c la concentration en g. p. 1000 de l'anticoagulant et considérons pour chaque valeur de c et de ΔV les rap-

ports $\frac{\Delta V}{c}$, on obtient les chiffres suivants:

FK.	—1,0	—1,2	—2,1	—2,0	—2,3	
C ₂ O ₄ Na ₂ . . .	—6,1	—6,5	—3,7	—4,7	—3,3	
C ₂ O ₄ K ₂	—1,9	—2,5	—1,9	—1,8	—1,9	
FNa.	—7,0	—6,5	—5,5	—4,1	—3,6	
Citrate. . . .	—0,8	—1,4	—1,7	—1,0	—1,1	—1,0
Liquoïde. . . .	+5,5	+7,0	+5,2	+1,4		

et, en faisant pour chacun des anticoagulants la moyenne, on obtient un chiffre que nous nous proposons d'appeler

TABLEAU X bis

Nature de l'anti-coagulant	1 p. 1000	2 p. 1000	3 p. 1000	4 p. 1000	5 p. 1000
FK.	— 1,0	— 2,4	— 6,4	— 8,0	—11,7
$C_2O_4K_2$	— 1,9	— 3,1	— 5,6	— 7,0	— 9,5
$C_2O_4Na_2$	— 6,1	—12,9	—11,1	—17,8	—16,7
FNa.	— 7,0	—13,0	—16,6	—16,5	—17,9

Nature de l'anti-coagulant	1 p. 1000	3 p. 1000	5 p. 1000	10 p. 1000	15 p. 1000	20 —19,9
Citrate trisodique	— 0,8	— 4,3	— 8,4	— 9,6	—16,6	p. 1000

Nature de l'anti-coagulant	0,2 p. 1000	0,3 p. 1000	0,5 p. 1000	1 p. 1000
Liquoïde	+ 1,1	+ 2,0	+ 2,6	+ 1,4

coefficient de contraction globulaire spécifique de l'anti-coagulant qui permettra de calculer pour un temps de contact moyen (3-5 heures) la contraction globulaire moyenne correspondant à chaque concentration.

Les chiffres obtenus sont les suivants:

FK. —1,7
 $C_2O_4K_2$. . . —2,0
 $C_2O_4Na_2$. . . —4,9
Fna. —5,3
Citrate. . . . —1,1
Liquoïde. . . +4,8

La contraction globulaire C sera pour chaque concentration c :

$$C = \left(\frac{\Delta V}{c} \right) \times c$$

CONSÉQUENCES DE LA DILUTION DU PLASMA

I. En général, et au bout d'un temps de contact suffisant, on note un rétablissement de la concentration moléculaire initiale plasmatique que l'addition de l'anticoagulant tendait à augmenter.

II. La concentration de tous les constituants plasmatiques baisse; cet abaissement est d'autant plus important que sont élevés d'une part le coefficient de contraction globulaire spécifique et d'autre part la concentration de l'anticoagulant nécessaire à empêcher la coagulation. Ces concentrations sont respectivement :

1 p. 1000 pour $C_2O_4K_2$ et $C_2O_4Na_2$.

3 p. 1000 pour FK, FNa.

5 p. 1000 pour le citrate trisodique.

0,2 p. 1000 pour le liquoïde.

D'où les variations globulaires moyennes nécessairement produites lorsqu'on empêche la coagulation par un de ces corps et traduisant leur pouvoir diluant effectif sur les constituants plasmatiques si on admet, ce qui est vrai en première approximation, l'égalité des volumes globulaires et plasmatiques :

Liquoïde	:	$+ 4,8 \times 0,2 = + 0,96$	p. 100
$C_2O_4K_2$	:	$- 2,0 \times 1 = - 2,0$	p. 100
$C_2O_4Na_2$	:	$- 4,9 \times 1 = - 4,9$	p. 100

FK	:	$-1,7 \times 3$	$= -5,1$	p. 100
Citrate	:	$-1,1 \times 5$	$= -5,5$	p. 100
FNa	:	$-9,3 \times 3$	$= -15,9$	p. 100

III. Une revue rapide de quelques constituants plasmatiques confirme ces données qualitativement et quantitativement.

A. Constituants minéraux.

a) Le chlore (voir plus loin).

b) Le phosphore. La question ne semble pas très nettement tranchée. L'addition d'oxalate n'altérerait pas le taux du phosphore d'après BARRENSCHEEN, DOLESCHALL et POPPER [20] qui affirment contrairement à LOWACZECK [131] que la défibrination ne cause pas de perturbations importantes. TOLSTOI [21] ne trouve pas de différence entre le sérum et le plasma oxalaté, alors que BUELL [132] emploie le citrate trisodique.

GROEBBER [133] et BLITSTEIN [10] s'accordent à rejeter oxalates, fluorures et citrate, au nom précisément de cette action diluante des anticoagulants. Ce dernier auteur qui a longuement étudié cette question donne des précisions qui s'accordent avec le pouvoir de contraction globulaire que nous avons fixé, sauf toutefois pour le citrate. A juste titre, il n'admet que l'emploi du liquoïde.

c). Le magnésium. L'influence des anticoagulants n'a pas fait l'objet d'étude systématique, quoique les auteurs qui se sont intéressés à la question, en aient employé divers. Leurs résultats sont donc sujets à caution. Toutefois, d'après GREENBERG et MACKAY [25] il semblerait que sérum et plasma ont la même teneur en magnésium.

B. Constituants organiques.

a) Les glucides. FOLIN conseille l'emploi de l'oxalate de potassium pour le dosage de la glycémie et indique un rapport $\frac{\text{glucose G}}{\text{glucose P}}$ voisin de 0,6 alors que SOMOGYI, POWER et EGE l'évaluent à 0,7. Il serait plus élevé, voisin de 0,8 avec le sang hipariné (TREMBLE et MADDOCK [134], SPANNUTH et POWER [33], MACKAY [135]).

CHORINE a étudié l'influence du fluorure de sodium à 10 p. 1000 et a trouvé une diminution du glucose plasmatique de l'ordre de 16 p. 100 (Comparer avec le chiffre que nous indiquons comme pouvoir diluant de cet anticoagulant), tandis que FONTES et THIVOLLE [136, 137, 138] ne trouvent pas d'écart appréciable avec du sang fluoré à 2 p. 100, ce qui tient vraisemblablement à l'imprécision de leur méthode de dosage.

Quoi qu'il en soit, l'étude de la répartition du glucose dans le sang des diabétiques anticoagulés, en particulier fluorés, est incorrecte, ce qui amène CHORINE à la suite de BRULL [139], POWER et PETERSON [140], à préconiser le dosage sur sang hépariné.

b). Les lipides. Des constatations analogues aux précédentes ont été faites par MAN et GUILDEA [34] pour les acides gras. SCHMIDT [35] en particulier trouve dans le plasma oxalaté à 2,4 p. 1000 un écart de 10-12 p. 100 par rapport au sang hépariné.

La question du cholestérol paraît indiscutable et nous avons nous-même avec P. MONNIER et LAZERGES [141], confirmé les travaux de SPERRY et SCHOENHEIMER [37], GAINSBOROUGH et MURRAY [40], Mme JUAN [41], BUGHNARD [38], CHABROL et PARROT [39], d'après lesquels le dosage est correct sur sang hépariné encore que d'après

CHORINE l'héparine comme tout autre anticoagulant provoque une dilution plasmatique.

c). Les protides. Les travaux de BLITSTEIN et de CHORINE ont montré que le plasma présente une teneur en protéides inférieure à celle du sérum et il ne s'agit pas d'une précipitation des protéides par les anticoagulants utilisés, puisque le rapport sérine/globuline n'est pas modifié; les auteurs américains et notamment MADDEN, GEORGE, WARRAICH et WHIPPLE ont d'ailleurs montré l'inexactitude de dosage de protéides pratiqués sur le sang additionné d'anticoagulants (en poudre ou en solution).

Le problème, au point de vue pratique, se ramène d'ailleurs aux conclusions de CHORINE:

1). Le taux réel des protéides ne peut être déterminé que sur le plasma frais obtenu par centrifugation rapide d'un sang non additionné d'anticoagulants.

2). La diminution de la concentration en protéides du plasma anticoagulé par rapport au plasma frais est due à la dilution par l'eau globulaire.

3). Les dosages pratiqués sur le plasma du sang anticoagulé ne peuvent être calculés exactement qu'en tenant compte du volume globulaire et en évaluant la teneur du sang total.

Ce dernier procédé de calcul est d'ailleurs applicable pour la détermination exacte de tout constituant sanguin peu diffusible.

II. EFFET DES ANTICOAGULANTS SUR LA RÉPARTITION

GLOBULO-PLASMATIQUE

DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX DU SANG

Les lois de l'osmose nous enseignent que les échanges d'eau entre deux solutions séparées par une membrane

hémiperméable sont sous la dépendance des concentrations moléculaires totales des deux solutions et de la perméabilité de la membrane qui, c'est du moins l'opinion classiquement admise, est en grande partie régie par la loi thermodynamique de DONNAN.

Or, le sang normal correspond à un équilibre osmotique entre globules et plasma, par suite, l'addition d'anticoagulant en poudre ou en solution hypertonique augmente la concentration moléculaire du plasma et amène la rupture de cet équilibre. L'établissement d'un nouvel équilibre exige :

1. — Le passage d'eau des globules vers le plasma (dilution du plasma).

2. Un échange ionique.

Cette deuxième condition, compte tenu de la première et de la perméabilité de la paroi globulaire aux différents ions, doit finalement aboutir à une double égalité électrique et osmotique.

Le chlorure de sodium grâce au taux élevé de sa concentration dans les deux phases sanguines et à sa grande diffusibilité se prête particulièrement bien à l'appréciation de ces échanges.

Les diverses expériences que nous avons faites avec différents anticoagulants nous permettent de dire que :

I) L'augmentation de la concentration moléculaire évaluée par l'abaissement du point de congélation du plasma, toujours nette au début de l'expérience diminue avec le temps sans devenir nulle, du moins pour des concentrations suffisantes d'anticoagulant.

II) Le chlore globulaire d'un litre de sang : $Cl\ G\ S = Cl\ G \times VG$ est constamment abaissé avec les fluorures et

les oxalates, mais toujours augmenté avec le citrate trisodique et le liquoïde. Ces variations sont sous la double dépendance de la concentration de l'anticoagulant et du temps de contact avec le sang. (Pour plus de détails, se rapporter à ce qui a été dit à propos de chaque anticoagulant).

III) Les variations du chlore plasmatique sont inverses de celles du chlore globulaire.

IV) Le rapport chloré globulo-plasmatique présente des variations en général comparables à celles du chlore globulaire, ces divergences tenant au fait qu'il y a toujours un certain décalage entre les échanges d'eau et ceux de chlore et cela parce que le chlorure de sodium n'est pas le seul électrolyte en cause.

Au total, le rapport chloré ne se rapproche de sa valeur réelle qu'avec le liquoïde à faibles concentrations, tous les anticoagulants minéraux amenant soit une diminution (oxalates, fluorures), soit une augmentation (citrate trisodique, liquoïde aux concentrations supérieures à 0,2 p. 1000).

Les résultats que nous avons présentés et la synthèse rapide que nous venons d'ébaucher, se ramènent finalement aux points suivants:

I. — Les anticoagulants créent une hypertonicité plasmatique plus ou moins bien compensée par l'eau venue des globules.

II. — Le chlore globulaire augmente au détriment du chlore plasmatique avec le liquoïde et le citrate trisodique.

III. — Le phénomène est inversé avec les oxalates et les fluorures.

IV. — Ces effets sont plus nets si les anticoagulants sont ajoutés en solution.

V. — Le pH, l'acidité de l'anticoagulant, la nature de l'ion anticoagulant prennent une importance qu'il conviendra de préciser.

CHAPITRE VI

ETUDE DE QUELQUES ELECTROLYTES

I. — GÉNÉRALITÉS

L'étendue des données précédentes que nous avons présentées sous une forme souvent schématique pour ne pas allonger démesurément cet exposé, nous a contraint parfois à ne faire état que du rapport globulo-plasmatique en passant sous silence les autres éléments du problème que l'interprétation générale des faits observés nous donnera d'ailleurs l'occasion de prendre en considération.

Si nous avons tenu à grouper les sels pourvus de propriétés anticoagulantes (puisque du point de vue pratique non négligeable c'est surtout d'eux qu'il s'agit) nous avons cru bon, pour comprendre leur action, d'indiquer rapidement, avant d'esquisser une synthèse des résultats acquis, les effets de quelques électrolytes choisis parmi les plus usuels d'après les raisons plus haut mentionnées. Souvent, et à regret, nous serons dans l'obligation de ne pas faire état de la totalité de nos résultats et de nous borner aux plus significatifs.

Entre les deux catégories d'électrolytes anticoagulants et non anticoagulants, il y a du point de vue de leur comportement ionique, une différence de principe: le méca-

nisme de l'action anticoagulante des oxalates et fluorures consiste, comme nous l'avons dit, dans la formation d'un sel de calcium insoluble, c'est-à-dire dans lequel l'anion anticoagulant $C_2O_4^{--}$ ou F^- est désionisé, donc inutilisable dans l'établissement de l'équilibre électroionique; les chiffres ci-dessous (tableau XI) permettent de se rendre compte que la précipitation calcique n'exerce d'influence appréciable que sur l'action des oxalates; encore cet effet est-il faible (de l'ordre de 10 p. 100) aux concentrations de 4 et 5 p. 1000. Quant aux fluorures, la seule concentration de 1 p. 1000 ne permet pas de négliger cette action.

C'est donc pour être rigoureux et tenir compte du nombre maximum de facteurs que nous avons signalé les différences ci-dessus qui constituent la seule distinction entre électrolytes anticoagulants et non anticoagulants (1).

(1) Le mécanisme d'action du citrate trisodique qui n'est pas une précipitation mais la formation d'un complexe dans lequel le calcium n'est plus ionisé, ne se prête pas à cette évaluation simple. Voir, à ce sujet, les travaux de Sabbatani (142, 143, 144). Quant au liquoïde, d'après Zunz, Mena-Ugalde et Vesselovsky (145), ses propriétés anticoagulantes in vitro paraissent en partie dépendre de la formation d'un complexe avec le fibrinogène.

Si on étudie l'action du liquoïde sur les trois phases essentielles du processus coagulant, on constate, tant in vitro qu'in vivo, que les effets inhibiteurs s'exercent à dose moindre sur la première phase (transformation du prosérozyme en sérozyme) que sur la deuxième phase (formation de la thrombine et surtout sur la troisième (action de la thrombine sur le fibrinogène), ainsi que c'est d'ailleurs habituellement le cas pour toute substance anticoagulante.

Au surplus, l'interprétation de l'anticoagulation par précipitation de l'ion Ca^{++} est vraisemblablement trop schématique, puisque Lumière et Mlle Sonnery (146) ont montré que l'aconitate de sodium, certains hyposulfites, certains sels d'étain, de zinc, de cadmium, de plomb, d'or (Veil et Gross (147)) à des doses variant selon le corps utilisé de 0,02 à 1 g par litre, sont pourvus de propriétés anticoagulantes.

TABEAU XI

Nature de l'anti-coagulant	Concentration des anticoagulants p. 1000				
	1	2	3	4	5
$C_2O_4K_2, H_2O$	46	23	15,3	11,5	9,2
$C_2O_4Na_2$. . .	33,5	16,7	11,2	8,4	6,5
FK.	14,5	7,25	4,8	3,6	2,9
FNa.	10,5	5,25	3,5	2,6	2,1

Pourcentage de la dose d'anticoagulant nécessaire à la précipitation du calcium.

II. — ETUDE DU CHLORURE DE SODIUM

Parmi les électrolytes susceptibles de nous intéresser, un méritait surtout une attention particulière par suite du taux élevé de sa concentration dans le sang, l'importance de son double rôle physico-chimique et physiologique, enfin et surtout parce que nous l'avons adopté comme électrolyte de référence.

Aussi bien, des ions très divers tels qu'oxalates, fluorures et citrates agissant sur les déplacements du chlorure de sodium, ce dernier doit lui-même agir sur sa propre répartition entre globules et plasma, cette action n'étant en somme qu'un cas particulier du principe général de déplacement des équilibres applicable aux systèmes hétérogènes comme aux systèmes homogènes.

En d'autres termes, le problème se ramène expérimentalement à étudier les effets de l'addition « in vitro » de chlorure de sodium au sang total; son importance est évidente du double point de vue médico-thérapeutique et physico-chimique.

Effectivement, les heureux résultats obtenus par l'administration du $ClNa$ dans certains cas d'azotémie tant expé-

rimementaux que cliniques, ont été signalés depuis longtemps. WEIL [148] et PASTEUR-VALLERY-RADOT [149, 150], ont en effet montré que l'administration de sel à des animaux soumis au régime déchloruré et à des brightiques azotémiques, produit respectivement une crise polyurique, sauvegarde de l'organisme et une baisse notable de l'azotémie. M. PASTEUR-VALLERY-RADOT a d'ailleurs pu suivre des sujets chez lesquels il a provoqué un abaissement ou une élévation du taux de l'urée sanguine suivant que leur régime était avec ou sans sel. La distinction avec RUDOLF [90, 91] des azotémies hypochlorémiques en

- 1) Azotémies par chloropénie.
- 2) Azotémies avec hypochlorémie sans chloropénie.
- 3) Azotémies avec chloropénie par chloropexie.

permet d'envisager la thérapeutique de rechloruration sous ces trois rubriques schématiques:

1). — Dans le premier cas, la rechloruration, véritable médication substitutive rétablit l'équilibre acido-basique tout en abaissant le rapport chloré.

2). — La seconde éventualité, par contre, ne doit pas impliquer cette thérapeutique car les sujets, malgré leur hypochlorémie ont de la rétention chlorée qui ne pourrait qu'être augmentée par le chlorure de sodium.

3). — Enfin, dans le troisième cas, la thérapeutique chlorurée semble n'intervenir qu'à titre d'effet diurétique comme l'ont montré les travaux de ROGER [151].

Tels sont esquissés les faits cliniques.

Le point de vue physico-chimique du problème se ramène selon CRISTOL [152] à trois schémas:

1). — Chloropénie et azotémie par manque de sel, justiciable au plus haut degré de la rechloruration.

2). — Chloropexie avec cytolyse entraînant l'alcalose par fixation de Na sur CO_3H^- également justiciable de la rechloruration.

3). — Hypochlorémie avec hyperazotémie, rechloruration contre indiquée.

Les données ci-dessus beaucoup trop schématiques permettent de situer l'important problème de la rechloruration qui donne lieu à des résultats et des théories souvent contradictoires. Il nous importait d'essayer d'éclaircir, dans le cadre que nous nous sommes tracé, le mécanisme physico-chimique de l'action du chlorure de sodium sur l'équilibre minéral du sang. Nous avons été ainsi amené à étudier l'influence de l'addition *in vitro* du NaCl au sang

Cl G.
total sur la valeur du rapport $\frac{\text{Cl G.}}{\text{Cl P}}$

Il s'agit toujours, en somme, de l'importante question de la perméabilité des globules rouges à l'ion chlore. La divergence marquée des opinions déjà émises nous a incité à entreprendre des recherches dont les résultats confirment certaines données déjà acquises, expliquent les divergences notées par des erreurs grossières et permettent de se faire ainsi une idée quantitative du phénomène.

Les auteurs qui ont étudié la répartition « *in vitro* » du chlore entre plasma et globules rouges après addition de ClNa ont donné des résultats contradictoires. Pour CHABANIER, LOBO O'NEILL et E. LELU [153], l'addition de cet électrolyte au sang « *in vitro* » a pour effet de redresser

Cl G.
fortement le rapport $\frac{\text{Cl G.}}{\text{Cl P}}$ Pour Max LÉVY et Mlle MIGNON

[14], l'addition « *in vitro* » de quantités faibles ou très fortes de chlorure de sodium au sang sous huile de paraffine, abaisse pour ainsi dire constamment le rapport G/P.

Désireux d'avoir une opinion ferme et si possible définitive, nous avons repris l'étude de la question pour essayer de voir quels sont les résultats exacts et les causes de l'opinion opposée.

Les expériences de CHABANIER et celles de M. LÉVY et

leurs collaborateurs ont été faites sur du sang recueilli à l'abri de l'air sous huile de vaseline pour empêcher le transport de CO_2 (et donc secondairement du chlore en sens inverse) des globules vers le plasma et ensuite l'évaporation de ce gaz. Toutefois cette précaution paraît pratiquement inutile puisque, pour M. LÉVY et S. MIGNON « *quel que soit le mode opératoire, adjonction de quantités faibles ou très fortes, en cristaux ou en solution, dans le sang à l'abri de l'air ou en contact avec l'atmosphère, le résultat est toujours le même* ». D'ailleurs, dans la note « *A propos du chlore sanguin* », MM. CHABANIER, GUILLAUMIN, LAUDAT, LÉVY, PAGET et VAILLE [13] disent: « *Si le dosage n'est pas trop retardé et malgré la théorie de GURBER-HAMBURGER, il semble pratiquement inutile de recueillir le sang à l'abri de l'air sous une couche d'huile* ». C'est pourquoi, pour éviter de nombreux inconvénients dans nos expériences multiples et souvent délicates, nous avons toujours recueilli le sang à l'air libre et défibriné à l'aide de billes de verre.

Le ClNa a été ajouté au sang, sous forme de solution très concentrée, de façon à ne pas diluer exagérément ce liquide. Les volumes ajoutés ont été toujours de 40 cm^3 par litre, soit dans certaines expériences 1 cm^3 par 25 cm^3 de sang et dans d'autres $0,20 \text{ cm}^3$ pour 5 cm^3 de sang. Les titres des solutions étaient 300, 250, 200, 150 et 100 p. 1000 ramenés après dosage précis à 297,75, 248,18, 198,50 148,88, 99,25 p. 1000. En définitive, nous pouvons dire que nous avons ajouté à 1040 cm^3 de sang (1000 cm^3 de sang + 40 cm^3 de ClNa):

avec ClNa à 300 p. 1000			11,91 g de ClNa	
—	250	—	9,92	—
—	200	—	7,94	—
—	150	—	5,95	—
—	100	—	3,97	—

Aussitôt après l'addition du ClNa, le mélange est rapidement homogénéisé par agitation douce et assez prolongée avec une petite baguette de verre, et ensuite centrifugé soit immédiatement, soit après un temps de contact variable. Nous retrouvons dans ce problème, les deux mêmes variables:

1. — Influence de la concentration en ClNa.
2. — Influence du temps de contact.

1. — Influence de la concentration en ClNa.

Il est facile de se rendre compte que, pour un même temps de contact, l'abaissement du rapport G/P est d'autant plus marqué que la concentration du ClNa ajouté est plus forte (tableau XII).

TABLEAU XII

Quantité absolue de ClNa ajoutée à 1000 cm ³ de sang	Variations p. 100 du rapport G/P		
	Sang de mouton	Sang humain	Sang humain
3,97	— 1,4	—25,5	— 6,9
5,95	—19,3	—23,4	— 6,9
7,94	—24,6	—23,4	—34,9
9,92	—24,6	—	—
11,91	—28,1	—29,8	—
Temps de contact en heures	3	3	0

2. — Influence du temps de contact.

Pour une même concentration de la solution de ClNa ajoutée, le rapport G/P se rapproche du rapport initial, sans toutefois en atteindre la valeur, d'autant plus que le temps de contact est plus long. L'influence du temps de contact semble moins nette dans le sang humain que dans

le sang de mouton, du moins si l'on s'en tient aux premières heures, mais au bout de vingt-quatre heures, le rapport se relève toujours comme l'indiquent sommairement les chiffres ci-dessous :

TABLEAU XIII

Temps de contact en heures	Variations p. 100 du rapport G/P		
	Sang de de mouton	Sang humain	Sang humain
0	—30	—43,9	—52,9
1	—24	—43,9	—40,4
3	—18	—40,3	—42,3
5	—14	—42,1	—
24	—12	—21,1	—32,7
Quantité absolue de ClNa ajoutée à 1000 cm ³ de sang.	11,91	11,91	11,91

Les expériences que nous venons de rapporter confirment entièrement les conclusions de M. LÉVY et S. MIGNON : l'addition « in vitro » au sang de quantités faibles ou fortes de ClNa abaisse le rapport G/P, abaissement constaté aussi bien dans le sang de mouton que dans le sang humain. Il ne peut être dû à des erreurs expérimentales, puisque nos bilans nous donnent la preuve que nous avons retrouvé le ClNa ajouté avec une approximation suffisante (1).

(1) Il est facile de reproduire à volonté les résultats de Chabazier et de ses collaborateurs, c'est-à-dire l'élévation du rapport G/P, nous les avons d'ailleurs obtenus avec les échantillons des mêmes sangs qui nous avaient déjà donné des résultats semblables à ceux de M. Lévy et S. Mignon. Il suffit, pour cela, après avoir ajouté le chlorure de sodium de ne pas agiter et d'effectuer le

dosage du Cl globulaire sur une partie aliquote du culot globulaire hémolysé et homogénéisé. On note, dans ces conditions, que:

1) — Dans tous les cas, les rapports G/P dans les sangs non mélangés sont supérieurs aux mêmes rapports dans les sangs où le ClNa a été uniformément réparti par agitation.

2). — Plus la concentration du ClNa diminue, plus le rapport chloré diminue.

3). — Pour les concentrations en ClNa. égales ou supérieures à 15 p. 100, il est supérieur à la valeur du rapport chloré du sang non salé.

4). — Pour les concentrations égales à 10 p. 100 de ClNa, les rapports sont inférieurs à ceux du sang initial.

5). — Plus le temps de contact est élevé, plus le rapport est bas, l'influence du temps de contact étant d'autant plus forte que la concentration du ClNa ajouté est plus forte.

L'explication de ce fait résulte simplement de la constatation suivante: Dans un tube, versons 5 cm³ de sang, ajoutons 0,20 cm³ de ClNa à 30 p. 100, observons le tube latéralement sans l'agiter, on voit une large trainée blanchâtre marquant le passage du chlorure de sodium et au fond du tube, où est arrivé le sel, un abondant culot blanchâtre également. Le culot et cette trainée sont des protéides précipités par le sel à forte concentration. Si on n'agit pas le mélange, le précipité ne se redissout pas, même au bout de 24 heures, il se redissout instantanément si on homogénéise le liquide. A ce moment, en effet, le ClNa n'est plus à la concentration de 30 p. 100 mais bien aux environs de 17 à 18 p. 1000, suivant les sangs examinés. Le phénomène n'est donc qu'une réaction bien connue: la précipitation des protéides par les solutions salines concentrées. Le chlorure de sodium ayant servi à précipiter les protéides reste alors dans la partie inférieure du tube après centrifugation, ce qui fait que l'on trouve un faux rapport globulo-plasmatique très élevé. Le même résultat est obtenu avec des concentrations en ClNa de 25, 20 et 15 p. 100, avec la seule différence que, plus la concentration diminue, moins le précipité est abondant et plus intense est la redissolution en fonction du temps. Avec une concentration de 10 p. 1000, le précipité est bien moins abondant et se redissout assez facilement dans un temps très court.

Une telle reproduction et explication des résultats de Chabanier et de ses collaborateurs doivent les faire considérer comme nuls du point de vue physiopathologique.

Des considérations plus détaillées sont exposées dans une de nos publications antérieures, avec P. Cristol et J. Fourcade (53).

III. — ETUDE DE QUELQUES ÉLECTROLYTES

L'étude des électrolytes tels que le nitrate de sodium, le bicarbonate de sodium, l'acétate de sodium, le tartrate de sodium, le bitartrate de potassium complète les résultats concernant les anticoagulants usuels et le chlorure de sodium. Nous pouvons, d'après les chiffres condensés dans le tableau XIV distinguer deux groupes:

I. Nitrate, bicarbonate et acétate de sodium.

Ces trois électrolytes produisent:

- a) Un abaissement de volume globulaire,
- b) Un abaissement du chlore globulaire.
- c) Un abaissement du rapport chloré (une exception curieuse se constate avec l'acétate de sodium à 15 p. 1000 qui ne produit que peu de modifications).

Généralement, ces abaissements dépendent de la concentration de l'électrolyte. L'influence du temps de contact se fait toujours sentir dans le même sens, c'est-à-dire tendance au rétablissement de l'équilibre initial (sans jamais y parvenir) après les inévitables perturbations du début.

II. Tartrate de sodium et bitartrate de potassium.

Ces deux sels doivent être rapprochés car leurs effets, quoique non absolument identiques présentent cependant des points communs.

- a) Le volume globulaire, toujours abaissé avec le tartrate de Na, jamais d'ailleurs au dessous de 15 p. 100 est pratiquement inaltéré par l'addition de bitartrate de K, les écarts constatés étant de l'ordre des erreurs expérimentales.

- b) Le chlore globulaire et le rapport G/P sont tous deux

constamment et fortement augmentés, ce dernier parfois jusqu'à 100 p. 100.

Le temps de contact est pratiquement sans action, en particulier sur le rapport chloré, c'est-à-dire que l'équilibre définitif est souvent réalisé au bout d'une heure.

Dans tous les cas, les variations dépendent étroitement de la concentration de l'anticoagulant.

CHAPITRE VII

INTERPRETATION GENERALE DES RESULTATS

I. OSMOSE ET PERMÉABILITÉ

Une remarque primordiale s'impose: dans la plupart des phénomènes biologiques, en particulier dans ceux que nous avons étudiés, les pressions osmotiques sont exclusivement mesurées par cryoscopie, aussi emploierons-nous le plus souvent le symbole Δ comme expression directe de la pression osmotique.

Au sujet de l'interprétation de ces mesures chez les êtres vivants, il importe de signaler qu'il est à peu près impossible, sauf cas particulier d'en tirer les résultats que l'on pourrait tirer de mesures effectuées sur la solution d'un corps pur; les liquides biologiques sont en effet de composition complexe et les mesures ne nous donnent qu'un résultat global ne permettant en général pas d'interpréter le détail de cette complexité.

Le problème qui se pose peut être traduit schématiquement par une expérience du type de celle de DE VRIES: une cellule, un organe, un être vivant, limité par une mem-

brane perméable à certaines molécules et non à d'autres est mis en contact avec des milieux dont l'excipient fondamental est capable de pénétrer; si l'équilibre osmotique n'est pas réalisé, c'est-à-dire si, pour les molécules auxquelles la membrane est imperméable, la pression intérieure n'égale pas la pression extérieure, il naîtra dans l'élément envisagé, des forces osmotiques qui vont tendre à se dépenser. Si cette dépense ne fait pas sortir le mécanisme de l'être vivant hors des limites de la vie normale, il s'ensuivra toute une série de phénomènes physiologiques.

La base de tout phénomène osmotique biologique est donc l'apparition provoquée ou naturelle d'un déséquilibre entre l'état osmotique interne et l'état osmotique externe.

D'une manière générale, si un tissu en contact avec un milieu qui lui est isotonique est brusquement transporté dans un milieu de pression notablement différente, il se produit une réaction qui, en général, tend au rétablissement de l'équilibre initial.

L'existence de phénomènes osmotiques implique l'existence d'une membrane dite semi-perméable susceptible d'être imbibée ou mouillée par un des liquides.

Cette notion de l'imbibition ou du mouillage paraît d'ailleurs correspondre aux définitions capillaires usuelles de la paroi mouillée par un liquide et être en accord avec la théorie de la perméabilité émise par RUHLAND [154] selon laquelle les substances de nature acide ou basique ne sont pas fixées par les cellules vivantes si elles se trouvent en solution aqueuse fortement colloïdale; au contraire, les substances qui peuvent être fixées forment des systèmes fortement dispersés. Cet auteur a étendu ses conceptions aux substances moléculairement dissoutes, il a émis l'hypothèse que la vitesse de passage de tels corps se rallen-

tit au fur et à mesure que le volume des particules augmente, cette vitesse étant déterminée par les relations qui existent entre le diamètre des pores et la grandeur des particules. On pourrait donc, d'après RUHLAND, admettre qu'il existe dans ces phénomènes une action d'ultrafiltration susceptible d'être modifiée par des effets secondaires dont nous aurons à reparler.

MOND et HOFFMANN, [155, 156] ont montré en 1928 à l'appui de ces vues, qu'en tenant compte soit des modifications de volume des hématies produites sous les influences osmotiques, soit du moment où commence l'hémolyse provoquée par différentes substances organiques, on constate qu'il existe une relation entre les *dimensions* des molécules et la *vitesse* de leur pénétration.

Quelle que soit d'ailleurs l'interprétation que l'on donne à la notion de perméabilité, restent surtout importants les facteurs physiques susceptibles de modifier la répartition ou la concentration des ions de part et d'autre d'un septum inerte et de jouer par conséquent un rôle dans les phénomènes de perméabilité, c'est-à-dire :

1°) *Les forces osmotiques* telles qu'on les envisage au point de vue classique et dont on trouvera une étude dans différentes monographies, notamment celles de VLES [191], KOPACZEWSKI [157] et GENIN [158].

On verra ainsi comment le phénomène d'osmose mis en évidence pour la première fois par l'abbé NOLLET au XVIII^e siècle fut étudié quantitativement par DUTROCHET en 1830, PFEFFER en 1877, DE VRIES, VAN T'HOFF, VAN DER WAALS... On verra comment s'est modifiée peu à peu la conception de ce phénomène, comment le rôle de la membrane d'abord admis puis rejeté, a été admis à nouveau.

Mais ces lois furent établies pour des membranes *théoriquement* hémiperméables qui, en fait, sont extrêmement rares. Pour l'étude qui nous intéresse ici interviendront non seulement le passage de l'eau, mais aussi, au bout d'un certain temps, celui des molécules ou des ions; le phénomène osmotique ne sera donc plus pur; il se compliquera de l'intervention d'autres processus que nous étudierons plus loin et qu'on peut grouper sous le terme de diffusibilité des substances en cause.

Sur la cellule elle-même, dont la couche limitante est bien loin d'être hémiperméable, comme l'ont montré de nombreux auteurs, la plasmolyse, si bien étudiées par de VRIES et HAMBURGER, se compliquera de déplasmolyse, c'est-à-dire du passage des corps dissous. D'autres complications sont d'ailleurs susceptibles d'intervenir, mais surtout *in vivo*; ce sont celles en rapport avec le métabolisme vital: désintégration des grosses molécules intra-cellulaires en molécules plus petites ou en ions (anatonose), d'où augmentation de la pression osmotique ou, inversement, recombinaison avec diminution de cette pression.

Il faudrait signaler encore divers cas, dits d'osmose anormale, dans lesquels les phénomènes sont inversés; ces anomalies ont suscité diverses explications dont les plus nettes découlent des travaux de GIRARD [159, 160, 161, 162, 163], qui fait jouer un rôle important aux phénomènes électriques, de FLUSIN [164] pour lesquels les faits sont sous la dépendance de différences d'imbibition de la membrane.

En dernière analyse, au point de vue qui nous occupe, quelle est la valeur de l'osmose?

Redisons encore qu'au sens primitif, l'osmose ne peut comporter que des échanges d'eau ou d'un autre solvant entre deux milieux perméables à ce solvant seul. Les lois classiques n'ont été établies que pour des membranes stric-

tement hémiperméables. Certains auteurs ont, par suite, été amenés à rejeter le cadre trop rigide de ces lois et à parler de phénomènes de nature osmotique, c'est-à-dire à comprendre sous ce nom tous les phénomènes, qu'ils soient d'osmose pure ou de diffusion d'éléments à travers une membrane.

2° *Forces de diffusion.* D'après les données les plus récentes, la diffusion dépend d'un certain nombre de facteurs, parmi lesquels on doit citer la mobilité des ions, par conséquent le degré de dissociation des molécules, la concentration moléculaire, la viscosité du solvant, la température, la conductibilité électrique... En fait, les lois de la diffusion vont se trouver, en ce qui nous concerne, extrêmement compliquées par la présence de membranes inertes ou vivantes.

Nous ne saurions, dans ce domaine, passer sous silence le phénomène d'OSTWALD-MESTREZAT [165, 166, 167], dont nos expériences avec les anticoagulants constituent une vérification et un corollaire. Bornons-nous à citer les conclusions de ces auteurs :

1) La vitesse de diffusion d'un ion moléculairement couplé à un ion moins diffusible que lui peut être accrue dans une proportion considérable lorsque le milieu vers lequel se fait la diffusion renferme un système moléculaire qui se prête à un échange avec les ions les plus mobiles du premier milieu. Ainsi s'établit, de proche en proche, indépendamment des ions peu diffusibles, et sans que le groupement moléculaire ne s'y oppose, une circulation en sens inverse d'ions de même signe, dont la vitesse est réglée par celle de l'ion dont le déplacement est le plus lent dans les conditions de l'expérience.

2) L'augmentation de vitesse réalisée par la présence d'un « *ion d'échange* » dans le milieu extérieur et la concentration des ions d'échange pour laquelle l'effet maximum

est réalisé, sont sous la dépendance de la valence de l'ion qui doit diffuser. L'augmentation des charges portées par un ion rend son passage de moins en moins rapide à travers un septum; l'effet optimum est obtenu dans ces conditions pour des concentrations de plus en plus faibles des ions d'échange dans le milieu extérieur.

Il s'agit là d'un cas typique, où joue, dans les échanges, la nécessité que soient satisfaites les lois électro-statiques qui règlent l'équilibre ionique des corps en solution.

Un autre, non moins important et d'ailleurs étroitement rattaché au précédent, est posé par la présence d'un côté de la membrane d'un ion non diffusible; on constate, en effet, que cette présence entraîne une répartition de tous les autres ions telle que les lois osmotiques habituelles ne jouent plus.

Ce cas, étudié par DONNAN, et dont MARINESCO [168] a précisé les différents aspects, a été étendu par le physico-chimiste américain LOEB au cas particulier des protéides sanguins, et notamment à l'équilibre globulo-plasmatique. Il ne nous appartient pas, dans le présent travail, de faire une étude critique des équilibres de DONNAN et de l'opportunité de leur extension aux milieux biologiques. BOUTARIC [169], DUCLAUX [170] et plus récemment KOPACZEWSKI [171] ont présenté ou rappelé, d'après d'autres auteurs, un certain nombre d'objections sur lesquelles nous ne saurions nous appesantir. Il n'en reste pas moins que le principe fondamental sur lequel reposent les équilibres de membrane est en somme la conséquence de la loi physique de conservation de l'électricité qui est elle-même un cas particulier de la loi universelle de conservation de l'énergie. Ce principe de base se ramène à ceci:

Si deux solutions différentes, contenant des électrolytes plus ou moins ionisés, sont séparés par une membrane per-

méable aux ions, on n'atteindra, avec le temps, l'équilibre de répartition que si la somme algébrique des charges que transportent les ions de part et d'autre de la membrane est constamment nulle; sinon, il se créera des forces électromotrices d'où des forces osmotiques (1) tendant à rétablir la neutralité électrique. Le passage d'anions dans un sens entraîne donc celui des cations dans le même sens *ou d'autres anions en sens inverse, en quantité osmotiquement équivalente*.

Il est bien évident que ce postulat fondamental ne saurait être discuté, aussi ne l'avons nous rappelé que pour donner toute leur importance aux forces dues à la nécessité de la conservations de l'équilibre électrique, condition de l'équilibre osmotique.

De multiples faits, d'importance moindre, sont susceptibles d'intervenir dans les phénomènes d'osmose et de perméabilité. Le lecteur désireux d'approfondir cette importante question s'adressera avec fruit au remarquable travail de E. GELLHORN et J. RÉGNIER [172], d'où nous extrayons le schéma ci-dessous, résumant et complétant les faits que nous venons de signaler:

Facteurs physico-chimiques

Concentration ionique;

Mobilité ionique;

Hydratation ionique;

(1) Cette dépendance des phénomènes électriques et osmotiques ne saurait être mieux mise en évidence qu'en remarquant que la formulé qui exprime la différence de potentiel existant entre deux solutions de tonicité différente et celle qui exprime le travail osmotique qui doit la supprimer ont la même forme mathématique, toutes deux dérivant de l'expression du travail à fournir pour passer de façon réversible d'un état à un autre.

Caractères spéciaux des ions;
Orientation moléculaire;
pH.

Facteurs physiques

Structure capillaire;
Température;
Viscosité;
Tension superficielle.

Nous ajouterons encore une remarque:

Dans la séance du 4 janvier 1938, de la Société de Chimie biologique [173], à propos de l'addition de ClNa *in vitro* au sang total, à la question de M. LAUDAT, « *si l'étude du temps de contact du chlorure avec les globules a été faite* », M. LÉVY a répondu que « *le phénomène serait instantané* ».

Nos expériences montrent nettement qu'il n'en est pas ainsi et que, notamment dans le cas du chlorure de sodium, la diminution du rapport globulo-plasmaticque est d'autant plus forte que le temps de contact du chlorure avec le sang est plus faible. En d'autres termes, l'équilibre n'est pas immédiat, du moins avec le sang de mouton; il semble que le phénomène soit plus rapide avec le sang humain. L'âge, les diverses affections... peuvent d'ailleurs intervenir dans ces faits qui méritent de plus amples recherches; nous les avons entreprises et les résultats s'avèrent dès maintenant intéressants du point de vue physiopathologique.

Nous tenons donc à signaler l'importance que présente, à notre avis, le facteur temps, si souvent négligé dans de telles études.

II. — EFFETS D'ÉLECTROLYTES OSMOTIQUEMENT ÉQUIVALENTS

Nous avons vu que les mesures cryoscopiques permettent d'apprécier l'effet osmotique d'un ion en vertu de la formule $p = 12 \Delta$.

Il est donc possible de déterminer à quelle concentration les sels que nous avons étudiés sont osmotiquement équivalents, ce qui revient à dire que de telles solutions placées contre une membrane rigoureusement semi-perméable produiraient dans un osmomètre de DUTROCHET la même dénivellation; nous sommes ainsi amenés à classer nos électrolytes à effet osmotiquement croissants de la façon suivante:

	Poids moléculaire
Citrate sodique.	258
Bitartrate de potassium.	188
Oxalate de potassium.	166
Tartrate de sodium.	194
Bioxalate de sodium.	112
Acétate de sodium.	82
Oxalate de sodium.	134
Fluorure de potassium.	58
Nitrate de sodium.	85
Bicarbonate de sodium.	84
Bifluorure de sodium.	62
Fluorure de sodium.	42

Il est aisé de constater que l'ordre n'est pas absolument l'ordre inverse des poids moléculaires, comme le voudrait la théorie, si les électrolytes obéissaient rigoureusement à la loi de Raoult; mais nous savons qu'il n'en est pas ainsi et qu'il faut tenir compte du degré de dissociation.

De plus, les effets de ces électrolytes sont appréciés d'après leur action sur le rapport globuloplasmatique du chlore et la constatation précédente prouve donc déjà qu'il doit être tenu compte d'autres facteurs.

TABLEAU XV

1	Nature de l'électrolyte	Concentra- tion de l'électrolyte gr. p. 0/00	Temps de contact en heures				
			0	1	3	17	24
—0,08	$\text{C}_2\text{O}_4\text{Na}_2$	2	— 7,1	— 7,1	— 2,0	— 2,0	— 3,0
	Citrate	4	+ 9,2	+ 6,9	+ 5,0	+ 3,2	+13,5
	Trisodique F K	2	— 1,9	— 3,0	— 4,5	+ 2,6	—
—0,12	$\text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2$	4	— 5,7	— 5,7	+ 2,4	— 1,1	— 2,2
	$\text{C}_2\text{O}_4\text{HNa}$	4	+ 9,3	+12,3	+ 8,8	+11,3	+10,9
—0,145	NO_2Na	3	—13,5	—16,6	—14,0	—12,0	—10,4
	F_2HNa	2	+39,7	+44,5	+41,1	+34,8	+49,4
—0,035	CH_3COONa	1	— 4,9	— 3,2	— 3,2	— 8,3	— 2,5
	Tartrate	1	+12,6	+13,0	+12,1	+10,7	+15,1
	acide de K Tartrate de Na	1	+ 2,7	+ 4,1	+ 4,7	+ 4,9	+20,4
—0,115	CH_3COONa	3	— 6,7	— 2,5	— 2,5	—12,2	— 4,0
	Tartrate acide de K	5	+47,4	+57,9	+61,6	—	+58,7
—0,135	CO_2HNa	3	— 9,5	—14,3	—13,9	—15,0	— 1,3
	Tartrate de Na	5	+20,6	+26,2	+20,2	+17,4	+23,8

EFFETS D'ÉLECTROLYTES OSMOTIQUEMENT ÉQUIVALENTS
SUR LE RAPPORT CHLORÉ GLOBULO-PLASMATIQUE

Le tableau XV, particulièrement démonstratif, permet de se rendre compte que les électrolytes à des concentrations osmotiquement équivalentes, c'est-à-dire correspondant au même abaissement cryoscopique, sont bien loin d'avoir les mêmes effets sur le rapport chloré, c'est-à-dire à la fois sur les chlorémies globulaire et plasmatique, et sur le volume globulaire.

Il en résulte que les seules considérations osmotiques, quelles que soit d'ailleurs leur importance, ne permettent pas d'interpréter les faits, puisque les électrolytes équivalents à ce point de vue peuvent provoquer non seulement une intensité différente du phénomène, mais parfois un renversement du sens dans lequel il se produit.

Voyons donc de près, dans chaque cas, comment on peut interpréter les faits.

III. OXALATE DE SODIUM ET DE POTASSIUM

D'après le graphique I, on peut calculer les correspondances osmotiques entre ces deux anticoagulants. Soient a et b les angles que font avec l'axe des abscisses les droites cryoscopiques de l'oxalate de sodium et de l'oxalate de potassium; il est facile de se rendre compte que :

$$\frac{\text{tg } a}{\text{tg } b} = \frac{6,5}{5} = 1,3$$

Donc à une concentration c p. 1000 d'oxalate sodique correspond une concentration $1,3 \times c$ de sel de potassium.

Remarquons d'autre part que le rapport des poids moléculaires des deux sels est $\frac{166}{124} = 1,24$ $166 = \text{P.M. de } \text{C}_2\text{O}_4\text{K}_2$
 $124 = \text{P.M. de } \text{C}_2\text{O}_4\text{Na}_2$

Les effets osmotiques sont donc, ici, inversement proportionnels aux poids moléculaires, c'est-à-dire que les deux électrolytes suivent la loi de **RAOULT** parallèlement, leur degré de dissociation sont du même ordre de grandeur et ce point ne manque pas d'intérêt, puisqu'il nous permettra d'étudier la pénétration dans les globules de l'ion C_2O_4 — abstraction faite du cation auquel il est combiné.

Si nous considérons les effets sur le rapport globulo-plasmatique de l'oxalate de sodium à 2 p. 1000, qui est la concentration à laquelle on l'emploie habituellement pour empêcher la coagulation, on obtient pour les temps de contact, 0, 1, 3, 17, 24 heures, les écarts ci-dessous :

—7,1 —7,1 —2,0 —2,0 —3,0

La concentration osmotiquement correspondante de l'oxalate de potassium est d'après ce que nous venons de dire : $2 \times 1,3 = 2,6$.

Dans le tableau IV, intrapolons les résultats entre les concentrations 2 et 3 p. 1000, on obtient pour le rapport G/P aux mêmes temps de contact, les chiffres suivants :

—1,9 —6,8 —3,4 —4,8 —3,7

Donc au début de l'expérience, à concentration osmotiquement équivalente, les effets de l'oxalate de sodium sont nettement plus marqués que ceux du sel de potassium.

Ceci est parfaitement en accord avec l'habitude qu'on a de préférer l'oxalate de potassium, d'autant que si on remarque que la nécessité d'empêcher la coagulation impose l'emploi des deux sels à la même concentration, l'écart est encore accru. L'explication de cette différence ne peut résider pour le cas des concentrations osmotiquement correspondantes dans l'inégalité d'hypertonie créée par les deux sels puisqu'elle est alors nécessairement la même, nous allons la chercher dans un instant.

Remarquons que la diminution du volume globulaire consécutive à l'hypertonie plasmatique s'accompagne en général d'une migration de ClNa des globules vers le plasma avec diminution du rapport G/P comme l'attestent nos chiffres.

Enfin, la concentration moléculaire totale du sérum que nous avons souvent évaluée par cryoscopie, toujours augmentée dans les minutes qui suivent la dissolution de

l'anticoagulant, tend à redevenir normale en fin d'expérience sans toutefois y parvenir, du moins dans les limites de temps considérées.

Il en résulte donc, et nos chiffres le montrent, que le déséquilibre chloré a en général persisté, quelquefois atténué, en particulier pour les faibles concentrations en oxalate. D'autre part, la diminution du tassement globulaire en fin d'expérience implique le passage d'eau vers les globules avec cependant une *diminution de la concentration totale du plasma et le maintien de l'augmentation du taux du ClNa plasmatique*. Ces faits ne peuvent se concilier qu'en admettant le passage de l'ion oxalique vers les globules en quantité osmotiquement équivalente au ClNa sorti, compte tenu de la légère augmentation de la concentration moléculaire totale du plasma par rapport à la valeur normale, augmentation qui subsiste toujours.

En fait, dans le cas des oxalates, nous avons pu faire quelques dosages directs d'ion oxalique et mettre cette pénétration en évidence. Toutefois, et voici à notre avis où doit être recherchée l'interprétation des différences ci-dessus notées entre le sel de sodium et le sel de potassium, *la vitesse de pénétration* ou, si l'on veut, *la diffusibilité* est différente avec l'un et l'autre anticoagulant.

Cette divergence s'interprète aisément à partir de la loi de GRAHAM d'après laquelle la vitesse de diffusion d'un corps dissous est inversement proportionnelle à sa masse moléculaire. Or, la masse moléculaire de l'oxalate de potassium est 166, celle de l'oxalate de sodium 134, le sel de sodium doit pénétrer plus rapidement ou plus facilement que les sels de potassium.

On peut objecter que le dosage s'adresse à l'ion oxalique et non à l'oxalate de sodium ou de potassium, mais il faut bien remarquer que le maintien de l'équilibre électrique

entraîne le passage d'un cation couplé à l'ion $C_2O_4^{--}$ (phénomène d'OSTWALD-MESTREZAT) et c'est le fait que ce cation est le sodium dans un cas, le potassium dans l'autre qui entraîne les différences effectivement constatées.

A cette raison, s'ajoute celle due à l'inégalité d'hypertonie plasmatique créée lorsque les deux anticoagulants sont employés à la même concentration.

Un point reste toutefois encore à expliquer : la légère mais réelle augmentation du rapport G/P assez souvent constatée pour les faibles doses d'anticoagulants (1 p. 1000) alors que pour les concentrations plus élevées la diminution est la règle ; ce fait n'est jamais signalé et pourtant parfaitement compréhensible.

En effet : l'oxalate, pour se dissoudre, attire de l'eau des globules vers le plasma, mais la quantité d'anticoagulant est trop faible pour que l'eau ainsi attirée soit considérable (Voir chiffres dans le tableau III) ; de plus, il s'agit d'eau de dissolution entraînant par conséquent avec elle du chlore en quantité proportionnelle. Mais la différence de tension osmotique provoquée par les molécules de $ClNa$ et celles d'oxalates (Voir courbes I) est telle que nous avons pratiquement constance du chlore globulaire avec diminution du volume, donc de l'eau globulaire. Il en résulte que le chlore des globules d'un litre de sang diminue proportionnellement au départ de l'eau, mais le chlore par litre de globules augmente. D'autre part, la constance de la concentration du chlore globulaire entraîne celle de la concentration plasmatique, mais avec dilution du plasma d'où diminution du chlore par litre de plasma et nouvelle cause d'augmentation du rapport globulo-plasmatique.

IV. FLUORURES DE SODIUM ET DE POTASSIUM

Les données générales indiquées pour les oxalates restent valables et nous avons dans l'ensemble à interpréter les mêmes faits, c'est-à-dire :

- a) Contraction du volume globulaire.
- b) Diminution en général du rapport chloré.
- c) Légère augmentation du même rapport pour un temps de contact bref aux concentrations en FK, de 1, 2 et 3 p. 1000.
- d) Augmentation toujours importante de la chlorémie plasmatique et de la concentration moléculaire totale.

Il y a toutefois entre les deux sels des différences remarquables au point de vue de l'intensité des phénomènes: le fluorure de sodium modifie en effet *beaucoup plus* le volume globulaire, le chlore globulaire et le rapport Cl G/Cl P que le fluorure de potassium, le pouvoir diluant de celui-ci étant toujours nettement plus faible.

Nous avons montré (p. 122) que ce pouvoir diluant pouvait être représenté par ce que nous avons appelé *la contraction globulaire spécifique de l'anticoagulant* ; et nous avons vu que nos expériences nous ont permis de l'évaluer à 1,7 pour FK et à 5,3 pour FNa.

D'autre part si nous nous rapportons aux courbes cryoscopiques, nous constatons que le rapport de leurs coefficients angulaires FNa/FK a une valeur moyenne de 2,3 alors que le rapport de leur pouvoir diluant est de

$$\frac{5,3}{1,7} = 3$$

Enfin le rapport inverse des poids moléculaires des deux sels est $42/58 = 0,72$ $42 = \text{P. M. de FK}$

$58 = \text{P. M. de FNa}$

Ceci nous montre à nouveau que l'effet osmotique seul est insuffisant à expliquer l'écart entre les effets des deux anticoagulants.

Par contre, on remarque que :

$$2,3 + 0,72 = 3,2$$

c'est-à-dire que si, au rapport des effets osmotiques représentés par les pentes à l'origine des courbes (ou des droites) cryoscopiques, on ajoute le rapport inverse des poids moléculaires, on obtient un chiffre qui, aux erreurs d'expérience près, représente le rapport des perturbations effectives des anticoagulants, représenté par le rapport de leurs pouvoirs diluants.

Ce résultat expérimental nous paraît digne d'intérêt car il objective l'hypothèse que nous avons déjà émise à savoir que, à notre avis, tous les phénomènes d'équilibre de membrane sont sous la dépendance d'une double influence :

1°) Phénomène osmotique mis en évidence par l'étude de l'abaissement cryoscopique, *insuffisant à lui seul à tout expliquer.*

2°) Phénomène biologique de perméabilité sélective, infiniment plus complexe, et objectivé par le pouvoir de diffusion des sels qui, *tous autres facteurs étant égaux par ailleurs*, est inversement proportionnel aux masses moléculaires conformément à la loi de GRAHAM.

Il n'en reste pas moins que les différences de pouvoir de contraction globulaire spécifique ou, ce qui revient au même, de pouvoir diluant, si considérables soient-elles, sont encore insuffisantes, dans le cas des fluorures, pour expliquer l'écart très important entre les modifications portant sur l'équilibre chloré et en particulier le fait que ces perturbations s'atténuent en fonction du temps quand il s'agit du fluorure de potassium et persistent sensible-

blement avec le sel de sodium; quant au volume globulaire, le temps atténue sa diminution avec FK, la maintient ou même l'augmente avec FNa. La concentration moléculaire plasmatique totale tend dans tous les cas à se rapprocher de sa valeur initiale, tandis que les concentrations chlorées du plasma sont toujours plus élevées avec le fluorure de sodium.

Nous sommes ainsi à nouveau amené à envisager la pénétration dans les globules de l'ion anticoagulant dont le rôle est de tendre au rétablissement de l'isotonie avec maintien du déséquilibre chloré.

Il est significatif de constater sur les tableaux V et VI combien le temps accentue les divergences entre les deux sels, c'est qu'intervient progressivement un fait dont on ne peut méconnaître l'importance : atteinte de la membrane globulaire avec répercussion sur sa perméabilité.

Effectivement, de tous les anticoagulants que nous avons utilisés, le plus hémolysant est le fluorure de sodium, cette hémolyse parfois légère et dont l'importance est en général proportionnelle à la concentration de l'anticoagulant a d'ailleurs une double origine : éclatement de certains globules et perméabilité de la membrane globulaire sous l'influence de l'effet toxique de l'anticoagulant. Cette augmentation de la perméabilité explique notamment que la sortie d'eau des globules s'accompagne d'une issue importante de chlore, elle explique également la pénétration de l'ion F^- à travers la paroi globulaire. Les taux de chlore plasmatique nous permettent de dire que le fluorure de sodium pénètre plus facilement quoique son poids moléculaire soit supérieur à celui du fluorure de potassium; il n'y a d'ailleurs là qu'un écart apparent à la loi de GRAHAM, écart dû à un effet toxique de FNa sur les globules, c'est-à-dire une action biologique due non à l'ion mais à la molécule considérée en bloc.

Cette interprétation, conforme à quelques observations de BLITSTEIN [10] et surtout à la réalité des faits, permet de comprendre l'importance des perturbations dues tout particulièrement au fluorure de sodium, ce qui serait difficile sans l'intervention d'un mécanisme spécial.

Quant au fluorure de potassium, il se comporte sensiblement comme l'oxalate de potassium et les légères augmentations du rapport appellent la même explication.

V. CITRATE TRISODIQUE ET LIQUOÏDE

Ces deux anticoagulants méritent d'être groupés car si leurs modes d'action dans l'anticoagulation (connus d'ailleurs seulement pour l'un d'entre eux) sont vraisemblablement différents, leurs effets sur les équilibres minéraux globulo-plasmatiques sont voisins.

C'est ainsi que l'augmentation du rapport G/P est systématiquement observée avec une intensité proportionnelle à la concentration en anticoagulant utilisée avec une augmentation correspondante non seulement du taux de chlore par litre de globules (Cl G) mais également de la chlorémie dans les globules d'un litre de sang :

$$\text{ClGS} = \text{ClG} \times \text{VG}$$

Le volume globulaire est lui-même toujours abaissé avec le citrate, normal ou légèrement augmenté avec le liquoïde.

Ces faits s'interprètent de la façon suivante :

I. L'hypertonie plasmatique due au liquoïde est nécessairement très faible, d'abord parce que cet anticoagulant est toujours employé à dose très faible (0,2 g p. 1000 suffit en général pour empêcher la coagulation), d'autre part, parce que son poids moléculaire non exactement

connu (et qui dépend d'ailleurs de son degré de polymérisation) est toujours élevé.

Il devrait toutefois en résulter un appel d'eau vers le plasma et une diminution du volume globulaire, or nous n'avons jamais fait une telle constatation, ce qui nous semble justifier l'interprétation suivante :

La paroi globulaire est imperméable au liquoïde, cette substance ne peut donc, par sa diffusion vers les globules contribuer au rétablissement de l'isotonie et c'est le chlore plus mobile, donc plus diffusible (voir phénomène d'OSTWALD) qui passe vers les globules d'où augmentation du chlore des globules d'un litre de sang; ce passage entraîne nécessairement de l'eau de dissolution, en faible quantité il est vrai puisque, comme nous l'avons dit, la différence de tension osmotique est faible, d'où légère augmentation du volume globulaire.

Quant au rapport chloré, il est, lui aussi, augmenté surtout pour les concentrations les plus élevées (0,5 et 1 p. 1000) et un temps de contact suffisant; son augmentation étant plus forte que celle du chlore globulaire malgré la légère dilution des globules, à cause de la diminution du chlore plasmatique plus importante que la légère concentration plasmatique.

Au surplus, nos chiffres montrent qu'au taux de 0,20 p. 1000 (pratiquement suffisant pour éviter la coagulation), les perturbations sont faibles, du moins au début de l'expérience, le temps ne pouvant que faciliter la diffusion du chlore; il en résulte au point de vue pratique que, *si l'analyse est effectuée immédiatement après le prélèvement*, le liquoïde peut à la rigueur être envisagé au taux de 0,20 p. 1000 pour la détermination du rapport chloré, mais nous ne saurions partager l'opinion de M. PAGET qui n'hésite pas à parler d'anticoagulant idéal, sans préciser notamment son temps de contact avec le sang.

II. L'action du citrate trisodique est particulièrement intéressante à étudier car, comme nous allons le voir, elle est, peut-on dire, intermédiaire entre celle des oxalates et fluorures alcalins et celle du liquoïde.

Les modifications produites sont, en effet :

- 1°) Diminution du volume globulaire;
- 2°) Augmentation du rapport chloré et, en général du chlore des globules d'un litre de sang.

Les travaux de FALTA et RICHTER-QUITTNER [174] ont montré que le citrate est un des anticoagulants altérant le moins la membrane globulaire, rendant par conséquent difficile non seulement le passage de l'ion anticoagulant peu diffusible, par définition, étant donnée la grosseur relative de sa molécule, mais aussi celui du chlore, surtout si on adopte les vues de HANKE et DONOVAN [175]. Ces auteurs admettent en effet qu'une partie du chlore sanguin se trouve sous forme de combinaison organique avec de grosses molécules telles que les protéïdes, donc pratiquement non diffusible.

Dans ces conditions, la contraction globulaire consécutive à la dissolution du citrate dans le plasma s'effectue sans diminution appréciable du chlore globulaire; ou du moins le chlore sorti des globules est très faible par rapport à l'eau. D'autre part, le chlore en combinaison organique est beaucoup moins important dans le plasma par suite du taux environ cinq fois moindre de protéïdes, donc le chlore plasmatique sera, lui, plus diffusible que le chlore globulaire (comme nous venons d'ailleurs de le signaler pour le liquoïde).

Donc le volume globulaire diminue parce que les concentrations assez élevées utilisées créent brutalement une différence de tension osmotique assez forte (voir courbes

de cryoscopie). La membrane globulaire inaltérée s'oppose au passage du citrate d'ailleurs naturellement peu diffusible. La sortie d'eau des globules n'a pas entraîné de chlore pour la même raison et il se produit le seul phénomène qui pouvait se produire: migration du chlore du plasma vers les globules pour le rétablissement de l'isotonie.

VI. ELECTROLYTES DIVERS

I. Chlorure de sodium.

Dans le mémoire consacré à la répartition « in vitro » du chlore entre plasma et globules et au cours de la discussion de leur communication, M. LÉVY et Mlle MIGNON, après avoir noté leurs résultats (reproduits par nous-mêmes [53]) écrivent et disent: « *De tels faits incitent à poursuivre l'étude de la perméabilité des globules rouges pour le chlore. Cette perméabilité ne paraît pas ressortir nettement dans les conditions expérimentales de nos observations* », et M. SANDOR de conclure que les globules seraient imperméables à l'ion chlore.

Une telle affirmation est contraire à tous les travaux classiques concernant la perméabilité des hématies aux anions, travaux que nous avons rappelés dans les pages précédentes et que l'on trouvera d'ailleurs résumés dans l'ouvrage de E. GELLHORN et J. REGNIER.

Les résultats que nous avons obtenus permettent, croyons-nous, d'émettre une opinion fondée sur des expériences menées avec toutes les précautions désirables comme le prouvent nos bilans. M. LÉVY et S. MIGNON calculant le pourcentage du ClNa ajouté resté dans le plasma, disent que la quasi totalité demeure dans le plasma, la proportion

oscillant entre 90 et 100 p. 100. Rien n'est plus exact si on effectue le calcul *par rapport au ClNa ajouté*. Cependant le pourcentage du chlorure ajouté, passé dans les globules, augmente nettement avec le temps de contact, les globules semblent donc être perméables à l'ion chlore ; néanmoins ce moyen indirect de mesure de la perméabilité ne peut donner de bons résultats, étant donnée la disproportion du Cl^- ajouté et du Cl^- passé dans les globules. Au contraire, le phénomène se voit nettement si on considère l'augmentation *relative* du Cl^- des globules. Cette augmentation varie, selon les concentrations en ClNa ajoutées de 20 à 50 p. 100. Par ce mode de calcul qui montre ce qui est entré dans les globules d'un litre de sang, on met en évidence sans conteste la perméabilité des hématies à l'ion chlore. La quantité de Cl^- passée dans les globules pour un temps de contact égal est par ailleurs d'autant plus considérable que la quantité de ClNa ajoutée au sang est plus grande ; et l'étude du temps de contact met bien en évidence le caractère progressif du phénomène.

La perméabilité des globules rouges du mouton et de l'homme pour le chlore paraît donc démontrée par nos expériences ; cette conclusion est absolument conforme aux données classiques les plus solidement établies.

Nous avons tenu à souligner ce fait et la démonstration expérimentale que nous en avons donnée, puisque sur lui repose pratiquement toute l'interprétation du mécanisme d'action des anticoagulants dans lequel il nous semble qu'il faut attribuer une importance primordiale aux échanges globulo-plasmiques d'ion chlore. Nous avons d'ailleurs antérieurement montré l'importance toute spéciale de cet électrolyte et les raisons qui nous l'ont fait adopter pour cette étude.

Quant au mécanisme lui-même du phénomène, il n'est qu'un cas particulier de ceux que nous avons déjà expliqués avec les anticoagulants. La très forte hypertonicité plasmatique entraîne une contraction globulaire importante, d'ailleurs insuffisante pour le rétablissement de l'isotonie possible seulement par la diffusion vers les globules du seul ion contenu en quantité appréciable, c'est-à-dire du chlore.

Le rapport chloré tend donc à se relever mais n'atteint jamais sa valeur initiale. Nous avons déjà dit à plusieurs reprises ce que nous pensons de cet *apparent* déséquilibre et comment nous le rattachons à l'existence dans le sang d'eau « non solvante » dont la proportion dépend de la concentration en protéides, donc du volume globulaire.

2. Nitrate, bicarbonate et acétate de sodium.

Une première remarque s'impose: les poids moléculaires de ces trois sels sont respectivement:

NO_3Na	P.M. : 85
CO_3HNa	P.M. : 84
CH_3COONa	P.M. : 82

c'est-à-dire pratiquement équivalents.

D'autre part si, comme nous l'avons fait pour les anticoagulants, nous calculons à partir de nos chiffres expérimentaux le pouvoir de dilution de ces sels représenté par le rapport des variations moyennes du volume globulaire à la concentration, nous obtenons les chiffres ci-dessous:

NO_3Na	$\Delta V/c = 4,1$
CO_3HNa	$\Delta V/c = 4,7$
CH_3COONa	$\Delta V/c = 3$

Rapportons-nous aux courbes cryoscopiques et nous remarquons que :

1°) Celles du nitrate et du bicarbonate sont pratiquement confondues.

2°) Le rapport des coefficients angulaires des droites nitrate ou bicarbonate à celui de la droite acétate, est très exactement égal à $4/3$, du moins entre les concentrations 0 et 15 p. 1000. Ce rapport est donc pratiquement égal à celui des contractions globulaires spécifiques.

Les différences dans les effets de ces sels à poids moléculaires équivalents sont donc bien dus ici aux différences d'effets osmotiques et pratiquement à eux seuls.

Il n'est pas surprenant que l'effet osmotique de l'acétate de sodium diffère assez nettement de celui des deux autres sels, car l'abaissement cryoscopique des électrolytes dépend, comme nous l'avons vu, de leur coefficient d'ionisation; or celui-ci est plus faible pour un sel organique dont la dissociation est relativement peu élevée.

Les chiffres du tableau XIV montrent encore que le chlore globulaire par litre de sang est toujours abaissé de façon décroissante dans l'ordre CO_3HNa , NO_3Na , CH_3COONa . On constate toutefois assez fréquemment que la chlorémie globulaire augmente légèrement avec le temps, ce qui permet d'affirmer que la tendance au rétablissement de l'isotonie se manifeste:

a) Par la pénétration dans les globules de l'ion considéré;

b) Par la pénétration concomittante d'une faible quantité de ClNa .

Ici encore l'acétate de sodium se distingue des deux autres sels par l'augmentation toujours plus nette de la chlorémie globulaire, donc par une diffusion moins intense vers les globules.

L'augmentation du taux du chlore globulaire est donc un moyen d'appréciation de la vitesse de diffusion d'un ion, tous autres facteurs étant égaux par ailleurs.

3. Tartrate neutre de sodium et bitartrate de potassium.

Ces deux sels ont respectivement comme poids moléculaires 194 et 188 que nous considérons comme équivalents. Nous les avons rapprochés car leur action sur le rapport chloré s'exerce dans le même sens: l'un et l'autre l'élèvent comme ils élèvent le chlore des globules d'un litre de sang et fréquemment (du moins dans le cas du bitartrate de potassium) le volume globulaire.

Le tartrate de sodium se rapproche du citrate trisodique et du liquoïde, mais l'intensité particulière du phénomène avec le bitartrate nous amène à faire état de son caractère acide, c'est-à-dire de l'intervention d'un phénomène particulier qui est l'équilibre chlore-bicarbonates justiciable du schéma suivant:

G	P
M^+	M^+
Cl^-	Cl^-
CO_3H^-	CO_3H^-

De part et d'autre de la membrane globulaire se trouvent des cations (M^+) et des anions représentés schématiquement par Cl^- et CO_3H^- . L'introduction d'un électrolyte à caractère acide AH dans le plasma produit donc la réaction:



d'où diminution de la réserve alcaline du plasma mais aussi de sa charge électro-négative par présence de l'ion A^- provenant de la dissociation plus ou moins importante de AH :



Le raisonnement précédent s'applique naturellement aussi bien aux bifluorures et aux bioxalates qu'au bitartrate.

L'augmentation de la charge électro-négative plasmatique crée un déséquilibre électrique d'où une force électromotrice d'ailleurs calculable par la formule de NERNST (voir p. 47), et comme corollaire une force osmotique qui tend au rétablissement de l'équilibre, ce qui est possible par la diffusion:

- a) Soit de A^- seul,
- b) Soit de A^- et Cl^- ,
- c) Soit de Cl^- seul.

La première éventualité est pratiquement irréalisable, car il existe peu d'ions plus diffusibles que Cl^- . C'est donc l'importance relative de la deuxième ou de la troisième possibilité, importance d'ailleurs fonction de la diffusibilité de l'ion A^- , qui règle l'augmentation du chlore globulaire, du rapport chloré, voire du volume globulaire par passage éventuel d'eau accompagnant la migration des ions électro-négatifs.

C'est ainsi que le bitartrate de potassium élève beaucoup plus le rapport G/P et le Cl G C que les bifluorures et les bioxalates diffusibles.

Il n'est pas surprenant de constater avec le tartrate de sodium un abaissement parfois assez net du volume globulaire, en particulier au bout d'un temps de contact suffisant, alors que le fait ne se voit pratiquement pas avec

la crème de tartre. Dans ce dernier cas, en effet, aux forces osmotiques habituelles s'ajoutent celles nées du déséquilibre électrique et qui entraînent vers les globules avec plus d'intensité du chlore, donc de l'eau.

VII. EXPLICATION D'ENSEMBLE DES FAITS

A la lumière des données précédentes, nous pouvons schématiser comme suit les faits observés :

1. Tout électrolyte, anticoagulant ou non, introduit dans le sang, cause une hypertonicité plasmatique en augmentant la concentration moléculaire totale du plasma d'où un déséquilibre en général important, instantané, et qui tend à cesser avec le temps, ce que nous avons pu constater en étudiant l'abaissement cryoscopique du plasma en cours et en fin d'expérience.

2. L'étude des échanges chlorés pendant le rétablissement de l'équilibre, nous a montré que les perturbations créées ne se ramènent pas à des échanges d'eau. Il n'y a pas de phénomène osmotique pur, mais plutôt *osmose et forces de diffusion*, au sens où nous l'avons défini.

Les échanges ioniques doivent nécessairement porter sur les électrolytes existant le plus abondamment dans le sang, c'est-à-dire chlorures et l'ion étranger ajouté, sans préjuger du cation.

3. Le maintien en cours et en fin d'expérience du déséquilibre chloré impose la conclusion que d'autres éléments que le chlorure de sodium concourent au rétablissement de l'isotonie et, comme nous venons de le dire, seul l'électrolyte ajouté au sang se trouve en quantité suffisante pour correspondre à une action quelque peu efficace. D'autre part, cette pénétration de l'anticoagulant dans les globu-

les a pu être mise directement en évidence dans le cas des oxalates, elle correspond, bien entendu, à une diminution du chlore des globules d'un litre de sang, ce qui revient à dire que, compte tenu de l'effet osmotique d'un électrolyte apprécié par son abaissement cryoscopique, lui-même fonction du coefficient d'ionisation, du poids moléculaire et de la concentration, l'augmentation du chlore globulaire traduit la diffusibilité de l'ion en l'absence d'autres facteurs susceptibles d'intervenir.

4. Nous avons pu constater (p. 110) que les électrolytes ajoutés au sang sous forme de solution iso ou hypertonique produisent sur les éléments du rapport chloré des perturbations plus importantes que s'ils sont introduits à l'état solide. Ce phénomène pourrait, à priori, sembler paradoxal puisque du fait de leur introduction en solution, ces électrolytes augmentent moins la concentration moléculaire plasmatique. Mais le facteur diffusibilité intervient et un électrolyte en solution, donc *déjà dissocié* est nécessairement plus diffusible, puisque son pouvoir de pénétration est augmenté de la force d'ionisation nécessaire à la production de cette dissociation.

5. La concentration en ions H^+ du plasma est un facteur susceptible de fausser l'interprétation des résultats quant à la perméabilité des hématies à un ion déterminé, surtout puisque c'est le taux du chlore globulaire que nous prenons comme test de cette perméabilité.

Effectivement, le déséquilibre osmotique créé dans ce cas et par suite l'augmentation de la chlorémie globulaire ne peut plus être *uniquement* considéré comme conséquence de la pénétration ou de la non pénétration de l'ion considéré, encore qu'elle soit tout de même plus marquée lorsque celui-ci n'est pas diffusible (Cf. bifluorures, bioxalates et bitartrate).

6. Les considérations précédentes ne doivent pas nous faire perdre de vue l'importance des facteurs osmotiques proprement dits. En d'autres termes, la perturbation créée par un électrolyte dépend plus ou moins directement de sa concentration finale dans le sang; et si, réduits à eux-mêmes, les phénomènes d'osmose sont insuffisants à tout expliquer, il suffit pour se rendre compte de leur rôle de jeter un coup d'œil sur les différents graphiques où nous avons représenté les variations du volume globulaire, du chlore des globules d'un litre de sang et du rapport G/P en fonction de la concentration des anticoagulants. Il va sans dire que des résultats comparables sont obtenus avec tous les électrolytes que nous avons eu l'occasion d'étudier, comme cela résulte du tableau XIV.

Ces quelques mots suffisent à montrer la nécessité de préciser très exactement la concentration d'un anticoagulant et surtout le peu d'importance qu'il faut attribuer aux travaux qui se contentent de l'apprécier de façon superficielle.

7. Nous avons souligné, à maintes reprises, la valeur du temps de contact également objectivée par nos graphiques. On peut constater que, en général, le phénomène est susceptible d'être schématisé en trois étapes correspondant à des répartitions globulo-plasmatiques différentes, à savoir :

- a) Déséquilibre brusque (0-quelques minutes),
- b) Tendance au retour à l'équilibre (1-3 heures),
- c) Obtention d'un nouvel équilibre osmotiquement équivalent, mais ioniquement ou même moléculairement différent (17-24 heures).

8. Enfin, nous tenons à souligner en terminant la valeur indiscutable que l'on doit accorder au phénomène biolo-

gique proprement dit: perméabilité sélective des hématies aux éléments minéraux. Il y a là un effet qui, par sa nature, est actuellement nécessairement obscur sinon mystérieux, car il est en rapport avec l'activité vitale elle-même.

En lui réside pour une bonne part la complexité de telles études sur des membranes biologiques auxquelles on ne peut jamais prêter des caractères fixes; ces membranes, comme tout tissu vivant sont en effet en transformation constante et nous ne saisissons que des étapes fugaces d'un phénomène à proprement parler dynamique et dont l'essence nous échappe.

Nous avons, dès le début de ce travail, annoncé la difficulté d'interpréter les faits dans ce domaine, aussi tenons-nous à mentionner à nouveau après avoir tenté de passer en revue quelques-uns parmi les plus simples des facteurs susceptibles d'intervenir, la valeur relative des indications précédentes.

La vie procède de façon simple et toujours identique, soit; mais c'est précisément cette simplicité qui nous échappe et qui ne pourrait vraisemblablement être atteinte que par la connaissance de toutes les données d'un problème qui dépasse la physico-chimie. Quelle que soit la valeur de cette affirmation, elle nous incline à la modestie; que cette idée soit la conclusion de notre étude.

CHAPITRE VIII

CONSEQUENCES DE NOS EXPERIENCES

Les faits que nous avons rapportés entraînent un certain nombre de conséquences que nous devons esquisser.

I. CONSÉQUENCES THÉORIQUES

I Equilibres de répartition globulo-plasmatiques.

Un fait semble acquis: lorsque l'équilibre de répartition d'un élément minéral (par exemple le chlore) a été troublé, il ne reprend plus sa valeur initiale; et ceci est mis en évidence de façon particulièrement saisissante par l'abaissement persistant observé sur le rapport chloré après addition de ClNa au sang total « in vitro ».

Le chlorure de sodium, comme toute substance existant dans les deux phases sanguines est caractérisé par un rapport de répartition, véritable constante physiologique, comme nous l'avons dit p. 48. Or, dans des expériences réalisées « in vitro », si une telle substance est inerte du point de vue métabolique, on doit admettre que sa répartition ne doit pas être influencée par les variations de concentration. En d'autres termes, si on représente, pour cette substance la perméabilité de la paroi globulaire par un

chiffre (par exemple le rapport des concentrations) cette perméabilité, caractéristique de la membrane, c'est-à-dire de l'état du sang considéré ne peut être influencée par le taux de la substance et doit toujours conserver la même valeur, *tous autres facteurs étant égaux par ailleurs*, sous peine d'enlever toute signification à la notion même de perméabilité.

Si donc, après addition de ClNa au sang total, nous trouvons un rapport chloré différent (toujours abaissé) nous pensons qu'il n'y a là qu'une apparence, que la réalité des faits est dissimulée par un facteur que nous étudions actuellement et dont nous avons déjà dit quelques mots occasionnellement. Nous n'avons nullement l'intention d'interpréter ici cet écart apparent à la loi de répartition, mais nous tenons seulement à souligner que de tels écarts ne peuvent être admis sans ôter de leur signification aux données les plus classiquement admises.

II. *Perméabilité des hématies.*

Nous disions au début de ce travail que la plupart des auteurs admettent la perméabilité relative aux anions, et avec plus de réserves une perméabilité relative aux cations. Quoi qu'il en soit, si on passe en revue les travaux de chimie analytique, on voit d'après ABDERHALDEN que les cations se partagent entre les hématies et le sérum de façon tout à fait inégale.

La répartition Na-K en est un exemple typique. Il semble d'ailleurs qu'on ne puisse admettre l'existence d'une imperméabilité complète ou d'une perméabilité très faible pour les sels en nous basant sur la constatation que ces sels se partagent inégalement entre le plasma et les hématies que si nous admettons que les sels se trouvent en propor-

tion assez considérable à l'état libre dans les globules. Or ce fait n'est pas reconnu par tous les auteurs. Il nous semble donc prématuré de fonder sur lui des conclusions trop rigoureuses.

Nous avons dit par ailleurs que nous faisons de l'augmentation de la chlorémie plasmatique avec valeur sensiblement normale de l'abaissement cryoscopique un test de pénétration des ions dans les hématies. Une telle déduction est entièrement conforme aux expériences d'HAMBURGER et VAN LIER [176], et de BOER [177]; ces auteurs ont en effet montré que les hématies placées dans des solutions isotoniques de SO_4Na_2 et de NO_3Na fixent des ions SO_4^{--} et NO_3^- . Plus directement encore en accord avec nous, ROHONYI [178] a constaté que dans une solution de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$, l'anion est fixé en quantité considérable dans les hématies, tandis qu'elles perdent pendant le même temps presque tout leur chlore.

D'autres renseignements sur cet échange d'anions ont été apportés en 1921 par WIECHMANN [179] par la démonstration de l'inégalité de comportement d'ions différents et par la mise en relief du facteur temps sur le partage définitif des ions qui est toujours d'au moins plusieurs heures malgré le faible trajet à parcourir.

Nos résultats expérimentaux nous amènent à faire intervenir le pH dans la notion de perméabilité; nous avons en effet fréquemment constaté que l'abaissement du pH plasmatique coïncide avec une augmentation du rapport chloré, cette augmentation étant d'ailleurs moins importante lorsque l'électrolyte acide ajouté au sang, est lui-même diffusible.

On sait d'autre part que MICHAELIS [180, 181, 182, 183, 184] a montré l'influence exercée par le pH sur la perméabilité des membranes de gélatine, en procédant à des

mesures potentiométriques; il a été établi que du côté acide du point isoélectrique se produit un passage plus facile pour les anions, alors que du côté alcalin, le même phénomène se produit pour les cations.

Il est d'ailleurs intéressant de préciser que ces faits sont en eux-mêmes différents de l'interprétation physico-chimique d'augmentation du rapport chloré par acidose (voir p. 167). Il s'agit en effet dans les expériences de MICHAELIS de rôle joué par la membrane elle-même, vraisemblablement en rapport avec des phénomènes de gonflement de micelles protéiques et d'adsorption sélective.

Indirectement, les travaux de MOND sont également à l'appui d'un effet du pH sur la membrane elle-même puisqu'il en résulte que pour un $\text{pH} < 8$ il se produit une perméabilité sélective avec les hématies du bœuf et du porc.

Ce rôle du pH se conçoit d'ailleurs aisément: nous savons que les globules rouges sont chargés négativement (ce qui est dû à la charge négative des lipides qui se trouvent dans la membrane limitante); ceci ne veut pas dire qu'il n'existe pas dans les couches limitantes des hématies d'autres phases de nature probablement protidique qui, elles, seraient chargées positivement dans les conditions de réaction normale du sang. Les recherches de MOND ont montré l'exactitude de cette supposition puisqu'il a pu obtenir pour un certain pH (8) une modification de la charge de la membrane transformant la perméabilité sélective pour les anions en une perméabilité sélective pour les cations. Il existe donc dans la phase limitante des hématies un ampholyte dont le point iso-électrique règle la perméabilité de la membrane.

Nous pensons qu'indirectement nos expériences appuient ces vues, en particulier la comparaison de l'action du tartrate de sodium et du bitartrate de potassium, par ailleurs

également non diffusibles (poids moléculaires très voisins). La très forte augmentation du rapport chloré avec le bitartrate prouve à la fois la migration du chlore par diminution de la réserve alcaline, mais aussi par action sur la membrane elle-même, ce second facteur étant lui-même mis en évidence par la diminution du même rapport sans intervention d'électrolytes étrangers sous l'influence de l'augmentation du pH (Rapprocher les courbes III du graphique VII et le graphique XIV).

Il résulte de ces quelques considérations que le problème de la perméabilité et en particulier celui de la perméabilité des hématies est loin d'être simple. Aussi bien la notion de perméabilité est elle-même assez subtile. HOMES a essayé en 1931 d'indiquer pour la définir, des grandeurs exactement mesurables. Il fit remarquer dans ce but que la vitesse de pénétration contrariée toujours par un certain mouvement de sortie était de ce fait sans cesse décroissante et, qu'étant fonction du temps, elle ne pouvait être choisie comme caractéristique de la perméabilité. Il proposa donc un facteur (a) qui définit indépendamment du temps une équation de vitesse donnée et qu'il désigna sous le nom de « facteur de vitesse ». Par ailleurs, la valeur du rapport des concentrations intérieures et extérieures, lorsque l'équilibre est atteint, représente pour lui un autre facteur caractéristique (R). Ces deux grandeurs a et R qui sont aisément calculables à partir de données expérimentales sont d'après l'auteur des caractéristiques suffisantes de la perméabilité d'une cellule pour une substance donnée et leurs variations permettent de suivre les modifications de cette perméabilité sous l'influence de conditions diverses.

Un tel procédé ne peut être appliqué aux hématies et nous avons antérieurement indiqué les raisons qui nous

ont fait, dans cette étude, accorder un rôle prépondérant au chlorure de sodium. Et si nous nous permettons une comparaison, nous dirons volontiers ceci : de même que le mouvement Brownien ou mouvement particulaire est une conséquence immédiate des mouvements irréguliers des molécules et par suite sert à les mettre en évidence, de même les mouvements du chlorure de sodium sont la conséquence d'autres mouvements ioniques plus subtils, moins facilement saisissables, et servant à la fois à les mettre en évidence et à en montrer la réalité.

Les conséquences *biologiques* de l'existence d'une perméabilité des hématies présentent nécessairement une grande importance, mais sur ce terrain de nouvelles difficultés surgissent du fait de la dépendance de cette constante individuelle des modifications chimiques du milieu intérieur et des influences neuro-humorales.

Nous savons d'ailleurs très peu de choses sur cet aspect du problème. Quelques rares expériences, assez peu démonstratives, effectuées par MULLER [185] et VELICOGNA [186] font jouer un rôle plus ou moins important à l'insuline, à la sécrétion thyroïdienne, la surrénale, le lobe postérieur de l'hypophyse... ces effets hormonaux étant en relation avec les corrélations nerveuses de ces glandes, il est sans doute plus conforme à la vérité de parler d'effets neuro-endocriniens.

Le protocole expérimental que nous avons indiqué permet précisément d'étudier dans différentes conditions pathologiques les variations de la perméabilité des hématies au ClNa , notamment par évaluation du pourcentage d'augmentation de la chlorémie globulaire. Nous avons entrepris cette étude chez des sujets atteints d'affections très diverses et nous pensons qu'il y a là un champ d'études intéressant notamment dans les relations entre perméabilité et métabolisme hydro-minéral.

L'étude de la perméabilité des hématies n'est donc pas seulement importante pour la compréhension de la physiologie cellulaire et si on tient compte des relations étroites qui existent entre le fonctionnement des couches limitantes des cellules et le métabolisme de ces cellules, nous pouvons dire, constatation particulièrement importante, que la perméabilité cellulaire dépend de l'ensemble du fonctionnement de l'organisme. Nous sommes par là amenés à entrevoir toute l'importance que pourra jouer en pathologie l'étude de la perméabilité *pourvu qu'on dispose d'un protocole expérimental qui permette de l'aborder*; nous pensons dans les pages précédentes en avoir indiqué un pour les hématies et qui permet notamment de faire une étude quantitative du phénomène, c'est-à-dire d'exprimer cette perméabilité par un chiffre.

En utilisant de façon systématique la connaissance que nous avons du mécanisme de la perméabilité, il nous sera possible de mieux connaître certains faits pathologiques. On peut même avoir l'espoir que cette étude appliquée aux problèmes cliniques fera progresser notre connaissance de la pathogénie et permettra de réaliser de nouveaux progrès thérapeutiques.

II. CONSÉQUENCES PRATIQUES

Nous restreignons cet aspect du problème au point suivant: est-il possible de déterminer correctement le rapport globulo-plasmatique du chlore avec un anticoagulant? Si oui, quel est le meilleur anticoagulant? Si non, y a-t-il un moyen de recueillir le sang qui permette d'éviter l'emploi d'anticoagulants ?

1) *Quel est l'anticoagulant qui modifie le moins le rapport chloré ?*

Pour qu'une telle question ait un sens, il faut bien entendu s'en rapporter à un sang admis comme témoin; nous pensons avoir, dans des pages précédentes, justifié à ce point de vue le procédé de défibrination.

Ceci posé, nous éliminons d'emblée et de la façon la plus catégorique tous les anticoagulants minéraux quelle que soit leur concentration. Si l'oxalate de potassium à 1 ou 2 p. 1000 est considéré comme acceptable, nous pensons pouvoir dire, d'après nos chiffres, que son emploi exigerait une centrifugation immédiate auquel cas l'anticoagulant n'est pas indispensable, mais l'exécution du dosage devient alors particulièrement délicate et exige de multiples précautions. Et même dans cette éventualité, on ne peut éviter de légères perturbations portant sur le rapport lui-même et sur le volume globulaire.

Le liquoïde mérite une indulgence particulière étant donnée la faiblesse relative des modifications qu'il produit; mais ici encore il convient d'effectuer rapidement l'analyse et en tout état de cause, il nous paraît un peu hasardeux de voir en lui l'anticoagulant « idéal » pour le dosage du chlore.

Nous ne pouvons avoir d'opinion sur les anticoagulants antidiastasiques, n'ayant pas eu l'occasion de les employer. Nous nous rangeons donc à l'avis des expérimentateurs qui les ont utilisés; nous remarquons toutefois la difficulté qu'on éprouve à se les procurer, surtout actuellement, et d'une façon plus générale leur prix de revient excessif qui rendent leur possession plus que problématique dans des laboratoires de clinique moyennement outillés.

Et pourtant la détermination du rapport chloré devient de plus en plus courante à la suite des travaux que nous avons rappelé. Il y a donc tout lieu de regretter qu'il n'existe pas un protocole expérimental de recueil du sang « standard » et quasi-officiel qui permette de comparer des travaux dont les résultats sont si souvent divergents; et il nous semble qu'avant de se mettre d'accord sur des conceptions pathogéniques ou thérapeutiques, il serait utile de réaliser l'unanimité sur la simple question de technique. En d'autres termes, nous nous permettons de souhaiter voir résolu une fois pour toutes le problème des anticoagulants et du rapport chloré par la suppression pure et simple de tout anticoagulant.

2) *Peut-on supprimer les anticoagulants pour la détermination du rapport chloré ?*

Effectivement, il est surprenant de constater le peu de faveur dont jouit le procédé de recueil du sang par défibrination anaérobie ou pratiquement telle. Nous n'insisterons pas sur ce point qui a déjà motivé de longues explications. Nous renvoyons aux pages précédentes pour les arguments qui, à notre avis, légitiment ce procédé applicable à toute détermination, au moins d'élément minéral, portant sur les globules et le plasma.

La défibrination du sang qui exige quelques précautions et une certaine habitude nous paraît donc le moyen le plus sûr de conserver l'équilibre globulo-plasmatique tel qu'il est « in vivo ». Naturellement, une telle affirmation comporte nécessairement des réserves, et nous redisons ici ce que nous indiquions dans les premières pages: le sang, du seul fait de sa sortie des vaisseaux, se trouve placé dans des conditions physiques, chimiques et

biologiques différentes. Il serait d'ailleurs bien audacieux de prétendre en somme transporter l'organisme dans un tube à essais sans que ne soient changés en rien les facteurs multiples et si souvent mystérieux qui caractérisent la vie. Il ne s'agit donc que d'un pis-aller, mais d'un pis-aller qui nous semble, du moins en l'état actuel de nos connaissances, parfaitement acceptable.

Aussi bien ce terme de pis aller doit s'appliquer à la plupart des investigations bio-chimiques jusqu'au jour vraisemblablement problématique où le biologiste sera à même d'effectuer ce qu'on a appelé un peu prétentieusement « l'analyse physico-chimique de la vie ».

CONCLUSIONS GENERALES

I. Lorsque le sang défibriné est abandonné à lui-même, le rapport chloré subit de faibles variations ne dépassant jamais ± 5 p. 100. Il est donc logique d'adopter ce procédé comme référence.

II. Si l'équilibre du sang est troublé par addition d'un électrolyte, le rapport globulo-plasmaticque de répartition des éléments minéraux ne reprend jamais sa valeur initiale. L'équilibre obtenu est différent quoiqu'osmotiquement équivalent, l'isotonie des milieux intra et extra-globulaires est en général retrouvée.

III. Du point de vue de leur action sur le rapport chloré globulo-plasmaticque représentant pratiquement le rapport électrolytes globulaires/électrolytes plasmatiques, les électrolytes que nous avons étudiés peuvent être classés en deux catégories:

- 1) Ceux qui abaissent le rapport G/P (Oxalates, fluorures alcalins, nitrate, bicarbonate, acétate de sodium.
- 2) Ceux qui élèvent ce rapport (Bioxalates, bifluorures, citrate trisodique, liquoïde, tartrate de sodium et bitartrate de potassium).

L'abaissement du rapport correspond toujours à un abaissement du volume globulaire, du chlore des globules d'un litre de sang avec augmentation de la chlorémie plas-

matique. Seul le liquoïde entraîne une légère augmentation du volume globulaire.

IV. Les effets ci-dessus indiqués dépendent pour un même électrolyte (anticoagulant ou non) :

- 1) De sa concentration;
- 2) De son temps de contact avec le sang.

On peut à ce dernier point de vue distinguer en général :

- a) Déséquilibre brusque peu de temps après l'introduction d'électrolyte;
- b) Tendance progressive au retour à l'équilibre;
- c) Obtention d'un nouvel équilibre osmotiquement équivalent stabilisé au bout de 20-24 heures.

V. La concentration moléculaire totale du plasma, brutalement augmentée au début de l'expérience tend progressivement à se rapprocher de sa valeur initiale, avec persistance d'une forte hyperchlorémie plasmatique; ceci implique le passage dans les globules d'un ion qui se substitue au chlorure de sodium, cet ion est l'ion ajouté au sang comme nous avons pu le montrer directement dans le cas des oxalates.

VI. L'étude des variations du chlore constitue donc un moyen facile de mettre indirectement en évidence la pénétration dans les hématies d'ions minéraux, pénétration soumise aux influences suivantes :

- 1) Diffusibilité propre de l'ion, fonction de son degré de dissociation et de son poids moléculaire;
- 2) Quantité de l'ion ajouté de laquelle dépend l'hypermotonicité plasmatique créée.
- 3) Temps de contact avec le sang qui facilite la diffusion, c'est-à-dire la pénétration.

- 4) Etat physique sous lequel l'ion considéré est ajouté au sang; diffusibilité plus grande dans le cas d'addition au sang d'une solution d'électrolyte.
- 5) Acidité du milieu et acidité propre du sel qui facilitent le passage des anions.
- 6) Perméabilité sélective des hématies vis-à-vis des ions.

VII. L'étude de la perméabilité des hématies présente un intérêt évident si l'on dispose d'un protocole expérimental permettant de l'évaluer par un chiffre de façon simple. Nous avons indiqué un tel procédé, dans le cas d'addition de chlorure de sodium, la perméabilité étant alors représentée par le pourcentage d'augmentation du ClNa globulaire lorsque les hématies sont placées dans une solution hypertonique de ce sel.

VIII. Les différences constatées dans le mode d'action des anticoagulants s'interprètent par les considérations suivantes:

- 1) La baisse du rapport chloré implique le passage de l'anticoagulant à travers la paroi globulaire, donc la perméabilité des hématies à cet anticoagulant avec comme corollaire la diminution de l'hypertonie plasmatique.
- 2) L'augmentation du rapport chloré correspond inversement à l'imperméabilité de la paroi globulaire à l'électrolyte considéré, entraînant la migration du ClNa plasmatique vers les globules, seul moyen de rétablissement de l'isotonie.
- 3) La diminution du chlore globulaire qui accompagne toujours celle du volume globulaire est due au fait que l'eau de dissolution entraîne nécessairement du chlorure de sodium.

IX. Deux grandes notions sont donc fondamentales dans le mécanisme d'action des anticoagulants :

- 1) Phénomène osmotique objectivé par l'abaissement cryoscopique: l'effet d'un anticoagulant sur le rapport G/P dépend de la pression osmotique qu'il développe dans le plasma.
- 2) Phénomène de diffusion de l'ion à travers la paroi globulaire sous la double dépendance:
 - a) De facteurs physico-chimiques (Voir n° VI).
 - b) De facteurs biologiques (perméabilité de la membrane globulaire).

X. Au point de vue pratique, nous tirons de nos expériences les conclusions suivantes :

- 1) Tous les anticoagulants à l'exception du liquoïde provoquent une dilution plasmatique ce qui, en dehors des perturbations portant sur l'ensemble des éléments du sang, est une cause d'erreur dans *tous* les dosages portant sur le plasma.
- 2) Pour les constituants non diffusibles normaux du sang (protéides, cholestérol, etc.), de telles déterminations sont toutefois possibles en présence d'un anticoagulant en évaluant le volume globulaire et la teneur du sang total. Mais ce procédé ne peut être appliqué aux constituants diffusibles (Cl, PO_4^{--} , urée, glucose, etc.), précisément à cause des perturbations causées notamment à l'équilibre minéral.
- 3) Pour les déterminations portant sur de tels constituants, tous les anticoagulants minéraux sont à

rejeter catégoriquement. Seul, le liquoïde peut être envisagé si l'analyse suit immédiatement le recueil du sang.

- 4) Nous pensons que le rapport chloré en particulier peut être correctement évalué en recueillant le sang sur billes de verre dans un flacon bouché à l'émeri et conservé à l'abri de l'air.
 - 5) Il convient donc de substituer aux rapports minéraux globulo-plasmatiques des rapports globulo-sériques.
-

BIBLIOGRAPHIE (1)

1. PAGET (M.). — A propos de la détermination et de la valeur du rapport chloré érythro-plasmatic. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, 19, 786-799.
2. LIMBECK. — *Arch. f. Exp Path.*, 1894, 35, 309.
3. WU (H.). — Separate analyse of the corpuscles and the plasma. *J. of biol. Chem.*, 1922, 51, 21-31.
4. EISENMANN (A.-J.). — The effect of potassium oxalate on electrolytes of blood and plasma. *J. of biol. Chem.*, 1926-1927, 71, 587-605.
5. THIERS (H.). — Les ions chlore du sang dans les rétentions chlorées des néphrites. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 11, 693-709.
6. GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Influence de quelques anticoagulants sur la répartition entre le plasma et les globules des constituants sanguins. 1^{re} note: migration de l'eau et du chlore. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, 12, 491-503.
7. — Influence du citrate trisodique sur la migration du chlore entre le plasma et les globules rouges du sang humain. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, 15, 1572-1574.
8. RASZJA (S.) et SLAWINSKI (A.). — Sur la question du passage du chlore des hématies dans le plasma sous l'influence du citrate de sodium. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, 15, 1569-1571.
9. NATTAN-LARRIER et TCHERNIAKOASKY. — Quelques examens chimiques sur des sangs moranylés ou liquoïdés. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, 857.
10. BLITSTEIN (I). — Influence de divers anticoagulants sur le dosage de certains éléments du sang. *Revue belge des Sciences médicales*, 1935, 7, 69-156.

(1) Dans les références ci-après, parmi les nombres qui succèdent au titre de la publication, le premier indique l'année, le second le tome et les suivantes les pages auxquelles le lecteur est prié de se reporter.

11. LUMIÈRE (A.) et COUTURIER (H.). — Sur l'emploi des sels de zinc comme anticoagulants. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, 1166.
12. HIGOUNET (H.). — Influence des anticoagulants sur la répartition des ions chlore entre le plasma et les hématies. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, 19, 52-59.
13. CHABANIER (H.), GUILLAUMIN (Ch.-O.), LAUDAT (M.), LÉVY (M.), PAGET (M.) et VAILLÉ (P.). — A propos du chlore sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, 19, 800-804.
14. LÉVY (M.), MIGNON (S.) et HÄFFNER (B.). — La répartition *in vitro* du chlore entre plasma et globules rouges. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, 20, 145-148.
15. CHORINE (V.). — Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (1^{er} mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 213-256.
16. — Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments sang (2^e mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 367-399.
17. FOLIN (O.) and BERGLUND (H.). — The retention and distribution of amino-acids with especial reference to the urea formation. *J. of biol. Chem.*, 1922, 51, 395-418.
18. FOLIN (O.) and SVEBERG (A.). — The sugar in urine and in blood. *J. of biol. Chem.*, 1925, 70, 405-426.
19. MARTENS (R.). — Contribution à l'étude de l'azote peptidique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, 10, 1336-1371.
20. BARRENSCHEEN (H.-K.), DOLESCHALL (F.) and POPPER (L.). — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. III. Mitteilung: Blutzucker und Phosphorsäurekurve. 1. Methodik. *Biochem. Z.*, 1926, 177, 39-49.
21. TOLSTOI (F.). — The inorganic phosphorus of the serum and plasma of ninety-one normal adults as determined by the BELL and DOISY method. *J. of biol. Chem.*, 1923, 55, 155-160.
22. HAAG (J.-R.) and JONES (I.-R.). — The calcium and inorganic phosphorus content of the blood plasma of normal dairy cattle. *J. of biol. Chem.*, 1935, 110, 439-441.
23. EVELETH (D.-F.). — Comparison of the distribution of magnesium in blood cells and plasma of animals. *J. of biol. Chem.*, 1937, 119, 289-292.
24. ABDERHALDEN (E.). — Zur quantitativen vergleichenden Analyse des Blutes. *Z. physiol. Chem.*, 1898, 25, 65-115.
25. GREENBERG (D.-M.) and MACKAY (M.-A.). — The determination of magnesium in blood with 8-hydroxyquinoline. *J. of biol. Chem.*, 1932, 96, 419-429.
26. GREENBERG (D.-M.), LUCIA (S.-P.), MACKAY (M.-A.) and PUFFS (E.-V.). — The magnesium content of the plasma and

- the red corpuscles in human blood. *J. of biol. Chem.*, 1933, 100, 139-148.
27. FOLIN (O.). — Unlaked blood as a basis for blood analysis. *J. of biol. Chem.*, 1930, 86, 173-178.
28. BENEDICT (S.-R.). — The analyses of whole blood. II. The determination of sugar and of saccharoïdes non-fermentable cooper-reducing substances. *J. of biol. Chem.*, 1931, 92, 141-159.
29. BENEDICT (S.-R.) and BEHRE (J.-A.). — The analyses of whole blood. III. Determination and distribution of uric acid. *J. of biol. Chem.*, 1931, 92, 161-169.
30. OLMSTED (J.-M.-D.). — *Amer. Journ. Physiol.*, 1935, 111, 551 et 1936, 114, 488. Cités par CHORINE V. : Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (2^e mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 367-399.
31. SOMOGYI (M.). — The distribution of sugar in normal human blood. *J. of biol. Chem.*, 1928, 78, 117-127.
32. SOMOGYI (M.). — Note on the distribution of blood sugar. *J. of biol. Chem.*, 1931, 90, 731-735.
33. SPANNUTH (J.-R.) and POWER (M.-H.). — Distribution of sugar in normal and diabetic blood and a comparaisou of the direct and indirect methods of measuring the corpuscle sugar. *J. of biol. Chem.*, 1931, 93, 343-358.
34. MAN (E.-B.) and GUILDEA (E.-F.). — A modification of the STODDARD and DRURY titrimetric method for the determination of the fatty acids in blood serum. *J. of biol. Chem.*, 1933, 99, 43-60.
35. SCHMIDT (L.-H.). — The nature of the difference in phospholipid content of oxalated and heperizined plasma. *J. of biol. Chem.*, 1935, 109, 449-453.
36. PAGET (M.) et PIERRART (G.). — Sur la teneur en cholestérol du sérum et du plasma. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, 126, 1204.
37. SPERRY (W.-M.) and SCHOENHEIMER (R.). — A comparaisou of serum, heparizined plasma and oxalated plasma in regard to cholesterol content. *J. of biol. Chem.*, 1935, 110, 655-658.
38. BUGNARD (L.-C.). — Coagulation du sang et teneur du sérum en cholestérol. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 102, 91.
39. CHABROL (E.) et PARROT (J.-L.). — Recherches comparatives sur la teneur en cholestérol du sérum sanguin, du plasma et des globules rouges, d'après une statistique de 112 observations. *C. R. Soc. Biol.* 1937, 125, 432.
40. GARDNER (J.-A.), GAINSBOROUGH (H.), and MURRAY (R.). — Studies on the cholesterol content of normal human plasma. VIII. A note on the effect of anticoagulants. *Bio-*

chem J., 1938, 32, 1457-1459.

41. JUAN-HUGONNET (S.). — La détermination du rapport cholestérol estérifié-cholestérol total dans le sérum sanguin. (Conditions de prélèvement des échantillons de sang. *Thèse Phie*, Montpellier, 1941, N° 286, 79 pages.
42. CHORINE (V.). — Dosage des chlorures sanguins. Influence des citrates sur la répartition du chlore entre les globules et le plasma. *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, 66, 169-179.
43. HAMBURGER (H.-J.). — Vergleichende Untersuchungen von arteriellem und venösem Blut und über den bedeutenden Einflutz der Art des Defibrinierens auf die Resultate von Blutanalysen. *Arch. f. Physiol. Suppl.*, 1893, 157.
44. HAMBURGER (H.-J.) et BUBANOVIC. — Sur la perméabilité physiologique spécialement vis-à-vis des cations. *Arch. intern. Physiol.*, 1910.
45. MAIZELS (M.). — The pénétration of erythrocytes by anions. *Biochem. J.*, 1934, 23, 337-350.
46. MAIZELS (M.). — Note on the permeability of erythrocytes to chloride. *Biochem. J.*, 1933, 27, 33-35.
47. HAMBURGER (H.-J.). — Anionenwanderung in Serum und Blut unter den Einflutz von CO₂, Säure und alkali. *Biochem. Z.*, 1918, 86, 309.
48. VAN SLYKE (D.-D.) and CULLEN (G.-F.). — Studies of acidosis. I. The bicarbonate concentration of the blood plasma; its significance and its determination as a mesure of acidosis. *J. of biol. Chem.*, 1917, 30, 289-346.
49. FREDERICA (L.-S.). — Exchange of chloride ions and of carbondioxide between blood corpuscles and blood plasma. *J. of biol. Chem.*, 1920, 42, 245-247.
50. HENDERSON (L.-J.). — Le sang, système physico chimique. Edit. *Les Presses Universitaires de France*, Paris, 1931.
51. LÉVY (M.), MIGNON (S.) et HAFFNER (B.). — La répartition « in vitro » du chlore entre plasma et globules rouges. Influence de la diminution de la tonicité du milieu et de l'hypochlorémie plasmatique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, 20, 305-311.
52. CRISTOL (P.), FOURCADE (J.), et BÉNÉZECH (C.). — Sur la répartition du chlore entre le plasma et les globules rouges après addition de ClNa au sang « in vitro ». *Bull. Soc. chim.*, 1940, 5^e série, 7, 62.
53. CRISTOL (P.), FOURCADE (J.), et BÉNÉZECH (C.). — Sur les effets de l'addition « in vitro » de ClNa au sang total. Variations du rapport globulo-plasmatique du chlore. Perméabilité des hématies à l'ion chlore. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, 21, 1279-1307.

54. ASHBY (W.). — *Amer. Journ. Physiol.*, 1924, 68, 585 et 611.
Cité par CHORINE (V.): Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (premier mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 213-256.
55. PONDER (E.) and ROBINSON (E.-J.). — The escape of potassium from rabbit red cells into hypotonic solutions. *Biochem J.*, 1934, 28, (2) 1940.
56. PONDER (E.) and ROBINSON (E.-J.). — *Journal of Physiol.*, 1935, 83, 352. Cité par CHORINE (V.): Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (premier mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 213-256.
57. DAYSON (H.). — *Journ. Cellular and comp. Physiol.*, 1937, 10, 247. Cité par CHORINE (V.): Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (premier mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 213-256.
59. DAYSON (H.). — Studies on the permeability of erythrocytes. *Biochem. J.*, 1934, 28 (1), 677.
59. DAYSON (H.). — Etudies on the permeability of erythrocytes. The cation content of erythrocytes of rabbit's blood in hyper and hypotonic sera. *Biochem J.*, 1936, 30 (1), 391.
60. DAYSON (H.) and PONDER (E.). — Studies on the permeability of erythrocytes. The permeability of « ghosts » to cations. *Biochem J.*, 1938, 32, 756-762.
61. KERR (S.-E.). — Studies on the inorganic composition of blood. The influence of serum on the permeability of erythrocytes to potassium and sodium. *J. of biol. Chem.*, 1930, 85, 47-64.
62. WAKEMAN, EISENMAN (A.-J.) and PETERS (J.-P.). — A study of human blood cell permeability. *J. of biol. Chem.*, 1927, 73, 567-580.
63. VAN SLYKE (D.-D.), WU (H.) and MC LEAN (F.-C.). — Study of gas and electrolyte equilibria in the blood. V. Factors controlling the electrolyte and water distribution in the blood. *J. of biol. Chem.*, 1923, 56, 765-849.
64. FALTA (W.) und RICHTER-QUITTNER (M.). — Über die chemische Zusammensetzung der Blutkörperchen. *Biochem. Z.*, 1921, 114, 145-151.
65. MAIZELS (M.). — The penetration of erythrocytes by cations. *Biochem. J.*, 1935, 29, 1970-1982.
66. HALVERSON (J.-O.), MOHLER (H.-K.) and BERGEIM (O.). — The calcium content of the blood serum in certain pathological conditions. *J. of biol. Chem.*, 1917, 32, 171.
67. HAMBURGER (H.-J.). — Die permeabilität der roten Blutkörperchen im Zusammenhang mit den isotonischen Coefficienten. *Z. Biol.*, 1889, 26, 414.

68. HAMBURGER (H.-J.). — Über den Einflutz von Säure und Alkali auf die Permeabilität der lebendigen Blutkörperchen, nebst einer Bemerkung über die Lebensfähigkeit des defibrinierten Blutes. *Arch. f. Physiol.*, suppl. 1893, 153.
69. HAMBURGER (H.-J.). — Der Einflutz des osmotischen Druckes auf das Volum roter Blutkörperchen und das Permeabilitätsproblem. *Biochem Z.* 1915, 71, 464.
70. LAUDAT (M.). — Le dosage du chlore dans le sérum sanguin et dans les liquides albumineux de l'organisme. *J. Pharm Chim.*, 1917, 16, 168.
71. DONNAN (F.-G.). — Theorie der Membrangleichgewichte und Membranpotentiale bei Vorhandensein von nicht dialysierenden Electrolyten. *Z. Elektrochemie*, 1911, 17, 572.
72. SLAWINSKI (A.). — Une nouvelle méthode pour la détermination de la quantité d'eau libre des hématies. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, 15, 982-991.
73. SLAWINSKI (A.). — Sur la détermination de la quantité d'eau libre des globules rouges du sang humain. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 96-104.
74. RASZEJA (S.) et SLAWINSKI (A.). — Sur la répartition du chlore entre le plasma et le cytoplasme des hématies dans le sang initial et le sang salé. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 1692-1707.
75. SORENSSEN (S.-P.-L.) and HOYRUP (M.). — Studies on proteins. III. On the composition and properties of egg albumin separated in crystalline form by means of ammonium sulphate. *Comptes rendus Trav. Lab. Carlsberg*, 1917, 12, 164-260.
76. ADAIR (G.-S.) and ROBINSON (M.-E.). — A direct method for the measurement of hydration of proteins. *Proc. of the phys. Soc.* in *J. of Physiol.*, 1931, 72, 2-3.
77. NICLOUX (M.). — L'eau des tissus. Possibilité de mettre en évidence une eau imperméable à l'alcool éthylique; sa fixation par les protéides, sa mesure, ses variations. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 822-864.
78. NICLOUX (M.). — L'eau des tissus. II. Nouvelle contribution à l'étude d'une eau liée aux protéides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, 20, 981-1032.
79. NICLOUX (M.). — L'eau des tissus. III. Recherches sur la diffusion de l'alcool éthylique chez les algues marines dans ses rapports avec l'hypothèse d'une « eau liée ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, 23, 1194-1202.
80. CRISTOL (P.), FOURCADE (J.), et BÉNÉZECH (C.). — Sur l'existence dans le sang d'une eau « non solvante ». Etude

- expérimentale. Note préliminaire. *Bull. Soc. chim.*, 1939, 5^e série, 6, 610.
81. CRISTOL (P.), FOURCADE (J.), et BÉNÉZECH (C.). — Nouvelle technique pour la mise en évidence de « l'eau non solvante » du sang. Remplacement du plasma par des solutions de ClNa. Influence de la concentration en ClNa sur la rapidité d'obtention de l'équilibre final. *Bull. Soc. chim.*, 5^e série, 6, 1288.
82. CASTAIGNE (J.), CHAUMERLIAC et VAURS. — Introduction chimique à l'étude clinique de la chlorémie. *J. méd. fr.*, juin 1930.
83. CASTAIGNE (J.). — Le chlorure de sodium dans l'organisme humain à l'état normal et pathologique. *J. méd. fr.* 1936, 25.
84. CHABANIER (H.), LOBO-ONELL (C.) et LELU (E.). — Sur l'étude couplée de la réserve alcaline et du rapport chloré comme test des déplacements de l'équilibre acide base. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 967.
85. LAUDAT (M.). — Chlore plasmatique et chlore globulaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 90, 1820.
86. LAUDAT (M.). — Etude de la chlorémie plasmatique et globulaire chez l'homme normal. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 100, 701
87. MACH. — Le traitement des hypochlorémies et la rechloruration post-opératoire. *J. de chirurgie*, septembre 1936.
88. RATHERY (F.). — Physiologie des reins in *Traité de physiologie normale et pathologique*, 1928, t. III.
89. RATHERY (F.). — Le syndrome hypochlorémique irréductible des néphrites chroniques. *Bull. et Mém. des hôp. de Paris*, juillet 1930, 1375.
90. RUDOLF (M.). — L'hypochlorémie. Pratique médicale française, 1929, 475.
91. RUDOLF (M.). — L'hypochlorémie. Thèse Paris 1931; 1 vol. 218 pages. Doin, éd.
92. LANGERON (L.) et PAGET (M.). — Recherches sur les chlorémies. *Questions médicales d'actualité*, 1938, N° 4, 1-11.
93. BLUM (L.). — Azotémie, chlorémie et réserve alcaline. *Bull. Soc. méd. des hôpitaux*, décembre 1928.
94. BLUM (L.), VAN CAULAERT et GRABAR (P.). — L'azotémie par manque de sel. Son mécanisme. *Annales de Médecine*, janvier 1929.
95. BLUM (L.) et VAN CAULAERT (C.). — Le rôle du sel dans les néphrites. Etude clinique, physiopathologique et thérapeutique. 1 vol. *Masson et Cie*, éd.
96. KAHANE (E.). — Sur l'état du chlore dans les substances biologiques. *Bull. Soc. Chim. biol.* 1937, 19, 721.

97. BOTTIN (J.). — Le dosage des chlorures sanguins. *Revue belge des Sciences médicales*, 1933, 5, 685-725.
98. BOTTIN (J.). — Le dosage des chlorures sanguins et le coefficient érythroplasmatique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 144-151.
99. DULIERE (W.-L.). — Une méthode pour la détermination du chlore dans les éléments du sang. *Revue belge des Sciences médicales*, 1935, 7, 10-20.
100. RAPPLEYE (W.-C.). — A simple application of the Volhard principle for blood plasma chlorides. *J. of biol. Chem.*, 1918, 35, 509-512.
101. PAGET (M.). — Détermination du rapport chloré érythroplasmatique. *J. Pharm. Chim.*, 1937, 26, 103.
102. PAGET (M.) et DUPONT (Y.). — Sur l'emploi d'un nouvel agent de défécation du sang. Application à la détermination de la chlorémie. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 117, 22.
103. WITHEHORN (J.-C.). — A system of blood analyses supplement. II. Simplified method for the determination of chlorides in blood of plasma. *J. of biol. Chem.*, 1920-21, 45, 449-460.
104. LÉVY (M.). — Note sur le dosage du chlore dans le sérum sanguin et les globules rouges. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 11, 633.
105. LÉVY (M.) et MIGNON (S.). — La détermination du rapport chloré globulo-plasmatique. (A propos du travail de MM. PAISSEAU, BOEGNER et VAILLE). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, 19, 234-243.
106. CHABANIER (H.), LOBO-ONELL (C.), et LELU (E.). — Sur le dosage du chlore dans le sang et dans les globules et la détermination du rapport chloré érythro-plasmatique. *Bull. de la Sté française d'Urologie*, 1936, 8, 279.
107. RAQUET. — Dosage des chlorures dans le sérum sanguin. *J. Pharm. Chim.*, 1928, 7, 487.
108. RASZEJA (S.). — Sur le microdosage du chlore plasmatique et globulaire dans le sang humain. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, 14, 873-884.
109. SLAWINSKI (A.). — Détermination du volume des corps diélectriques en suspension ou en dépôt dans un électrolyte par la méthode des « deux tubes ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 448-460.
110. SLAWINSKI (A.). — La méthode de centrifugation ou la méthode de conductibilité électrique pour la détermination du volume globulaire du sang. Comparaison des deux méthodes au point de vue de leur exactitude. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 1575-1577.
111. PONDER (E.) and SASLOW (G.). — The measurement of red cell volume. *J. of Physiol.*, 1930, 70, 18-37.

112. PONDER (E.), and SASLOW (G.). — The measurement of red cell volume. II. Alterations in cell volume in solutions of various tonicity. *J. of Physiol.*, 1930, 70, 169-181.
113. PONDER (E.) and SASLOW (G.). — The measurement of red cell volume. III. Alterations of cell volume in extremely hypotonic solution. *J. of Physiol.*, 1931, 73, 267-296.
114. MILLAR. — *Quart. Journ. Exp. Physiol.*, 1929, 15, 187. Cité par Chorine (V.): Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (1^{er} mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 213-256.
115. HAMPSON (A.-C.) and MAIZELS (M.). — The effects of variations in pH on the volume of red cells. (Preliminary communication). *J. of Physiol.*, 1926-1927, 62, Proceedings of the physiological Society, xvi-xviii.
116. ETTORY (J.) et GRANGAUD (R.). — Sur la détermination du volume globulaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 532.
117. ETTORY (J.) et GRANGAUD (R.). — Sur la détermination du volume globulaire; influence des anticoagulants sur le volume globulaire déterminé par photométrie. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 181. x
118. ETTORY (J.) et GRANGAUD (R.). — Essai de raccordement du procédé de l'hématocrite et de la méthode photométrique de détermination du volume globulaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 128, 191.
119. VLES (F.). — Cours de Physique biologique. Tome I: Introduction à la chimie-physique biologique. Fascicule I: L'osmose et les propriétés qui sont liées à la concentration moléculaire des solutions. 1 Vol. *Vigot éd.*, Paris, 1927, pp. 26-33.
120. WARBURG (E.-J.). — Einige Bemerkungen über die Verteilung von Anionen zwischen Blutkörpern und Plasma. *Biochem. Z.*, 1920, 107, 252-255.
121. FREDERICQ (L.). — Recherches sur les constituants sanguins. Gand, 1878. Cité par EISENMAN (A.-J): The effect of potassium oxalate on electrolytes of blood and plasma. *J. of biol. Chem.*, 1926-1927, 71, 587-605.
122. CRISTOL (P.) et BÉNÉZECH (C.). — Méthode physico-chimique de détermination de «l'eau liée» du sang. Communication faite à la *Société Chimique de France*, section de Montpellier, séance du 10 avril 1943.
123. DAUTREBANDE et DAVIES (H.-W.). — A study of chloride interchange between corpuscles and plasma. *J. of Physiol.*, 1922, 36.
124. BOULANGER (P.) et DRIESSENS (J.). — Les variations du quotient chlore globulaire-chlore plasmatique; ses rapports avec la réserve alcaline chez les opérés de chirurgie générale. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 112, 391.

125. AMBARD (L.). — Physiologie normale et pathologique des reins. 1 vol. Paris, 1919.
126. BENARD (H.), LENORMAND (J.) et MERKLEN. — Hyperchlorémie globulaire, hyperchlordrie bulbaire et acidose rénale. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 1929, 3^e série, 53, 208-215.
127. RATHERY (F.) et RUDOLF (M.). — Crises d'azotémie aiguës récidivantes. Chlorures sanguins et réserve alcaline. *Bull. Soc. méd. hôp.*, 1928, 3^e série, 52, 1363-1368.
128. RATHERY (F.) et RUDOLF (M.). — Néphrite aiguë. Azotémie et réserve alcaline. *Bull. Soc. méd. hôp.*, 1929, 3^e série, 53,
129. RATHERY (F.) et RUDOLF (M.). — Néphrite chronique. Réserve alcaline; chlore sanguin et plasmatique. *Bull. Soc. méd. hôp.*, 1928, 3^e série, 52.
130. AMBARD (L.), SCHMIDT (F.) et ADNOT (A.). — Des variations de la réserve alcaline. *Bull. Soc. méd. hôp.*, 1926, 3^e série.
131. LAWACZECK (H.). — Über die Dynamik der Phosphorsäure des Blutes. *Biochem Z.*, 1924, 145, 351-372.
132. BUELL (M.-V.). — On the Phosphorus compounds in normal blood. *J. of biological Chem.*, 1923, 56, 97-107.
133. GAEBBER (O.-H.). — The effect of anticoagulants on determination of inorganic phosphate and protein in plasma. *J. of biol. Chem.*, 1933, 99, 99-107.
134. TRIMBLE (H.-C.), and MADDOCK (S.-J.). — A study of the effect of insulin upon the sugar content of erythrocytes, including a comparison of the direct and indirect methods of measurement. *J. of biol. Chem.*, 1928, 78, 323-335.
135. MACKAY (E.-M.). — The distribution of glucose in human blood. *J. of biol. Chem.*, 1932, 97, 685-689.
136. FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — Recherches expérimentales sur le microdosage des substances réductrices du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, 9, 353-445.
137. FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — Identité du taux glucidique dans le plasma vivant et dans le plasma fluoré à 2 p. 1000. *C. R. Soc. Biol.* 1929, 100, 1196.
138. FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — La perméabilité des hématies aux glucides plasmatiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 100, 1198.
139. BRULL (L.). — *Arch. intern. Physiol.*, 1930, 32, 138.
140. POWER (M.-H.) and PETERSON (R.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1931, 28, 548. Cité par CHORINE (V.): Influence des anticoagulants sur le dosage des éléments du sang (premier mémoire). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, 63, 213-256.
141. MONNIER (P.), LAZERGES (P.) et BÉNÉZECH (C.). — La détermination du rapport cholestérol estérifié/cholestérol to-

tal dans le sérum sanguin. Conditions de prélèvement. Communication faite à la Société des Sciences médicales et biologiques de Montpellier, séance du 8 janvier 1943.

142. SABBATANI (L.). — Calcium et citrate trisodique dans la coagulation du sang, de la lymphe et du lait. *Arch. ital. de Biologie*, 1901, 36, 397.
143. SABBATANI (L.). — Azione del citrato trisodico ed importanza del calcio-ione. *Policlinico*, vol. ix, 1902.
144. SABBATANI (L.). — Le calcium-ion dans la coagulation du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, 54, 716.
145. ZUNZ (E.), MENA-UGALDE (C.) et VESSELOVSKY (A.). — A propos des propriétés anticoagulantes du polyanéthol-sulfonate sodique ou liquoïde. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, 336.
146. LUMIÈRE (A.) et SONNERY (S.). — Sur les propriétés anticoagulantes des sels d'or et de quelques autres sels chimiquement définis. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 117, 443.
147. WEIL (P.-E.) et GROSS (M.). — Les sels d'or organiques rendent le sang incoagulable. *C. R. Soc. Biol.*, 108, 393.
148. WEILL (A.). — L'azotémie au cours des néphrites chroniques. *Thèse Paris*, 1913.
149. PASTEUR VALLERY-RADOT. — Etude sur le fonctionnement rénal dans les néphrites chroniques. *Thèse Paris*, 1918.
150. PASTEUR VALLERY-RADOT. — Variations du taux de l'urée sanguine chez les brightiques azotémiques sous l'influence de l'ingestion de NaCl. *C. R. Soc. Biol.*, 1914, 760.
151. ROGER (H.). — Les solutions hypertoniques de NaCl en injection intraveineuse; leur action sur la sécrétion rénale. *Acad. de Méd.*, septembre 1903, 649.
152. CRISTOL (P.). — La physico-chimie des hypochlorémies et le problème de la rechloruration. *Gazette Médicale de France*, 1934, juillet, n° 13.
153. CHABANIER (H.), LOBO-ONELL (C.) et LELU (E.). — Influence de l'addition « in vitro » de NaCl et de CO_3Na_4 au sang total sur la répartition du Cl et du CO_2 entre plasma et globules et sur le pH globulaire et plasmatique. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, 1052.
154. RUHLAND (W.). — Zur Kritik der Lipoid und der Ultrafiltertheorie der Plasmahaut nebst Beobachtungen über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloïde für ihre Vitalaufnahme. *Biochem. Z.*, 1913, 54, 59.
155. MOND (R.) und HOFFMANN (F.). — Untersuchungen an künstlichen Membranen, die elektiv anionenpermeabel sind. *Pflügers Arch.*, 1924, 203, 247.

156. MOND (R.) und HOFFMANN (F.). — Weitere untersuchungen über die Membran struktur der roten Blutkörperchen. Die Beziehungen zwischen Durchlässigkeit und Molekular-volum. *Pflügers Arch.*, 1928, 219, 467.
157. KOPACZEWSKI (W.). — *Traité de Biocolloïdologie*, tome I, pp. 167-209 et tome IV, p. 265 et suivantes. 1 vol. *Gautier-Villars éd., Paris*, 1930-1934.
158. GENIN. — Osmose, dialyse, ultra-filtration. 1 vol. *Dunod éd., Paris*, 1928.
159. GIRARD (P.). — Mécanisme électrostatique de l'hémiperméabilité des tissus vivants aux électrolytes. *C. R. Ac. Sc.*, 1910, 150, 1446.
160. GIRARD (P.). — Mécanisme électrostatique de l'osmose. *C. R. Ac. Sc.*, 1910, 151, 99.
161. GIRARD (P.). — Recherches expérimentales sur le mécanisme physico-chimique de l'hémiperméabilité des cellules vivantes aux électrolytes. *J. Physiol. et Path. gén.*, 1910, 12, 471.
162. GIRARD (P.). — Mouvements osmotiques anormaux. *C. R. Ac. Sc.*, 1911, 153, 401.
163. GIRARD (P.). — La perméabilité sélective des parois vivantes et inertes aux ions et les conséquences chimiques qu'elle comporte. *Ann. de Physiol.*, 1925, 1, 194.
164. FLUSIN. — Du rôle chimique de la membrane dans les phénomènes osmotiques. *Thèse Doct. Sciences*, Paris 1907.
165. OSTWALD (W.). — Elektrische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände. *Z. physik. Chem.*, 1890, 6, 71.
166. MESTREZAT (W.), et GARREAU (Y.). — Représentation des échanges ioniques dans les tissus. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 92, 1439.
167. MESTREZAT (W.) et GARREAU (Y.). -- Contribution expérimentale à l'étude du transport des électrolytes. Mobilisation des ions par échanges intermoléculaires. *C. R. Ac. Sc.*, 1925, 180, 1069 et 1266.
168. MARINESCO (N.). — Equilibres de membranes. 1 vol. *Hermann et Cie éd. Paris*, 1934. Préface de F.-G. DONNAN.
169. BOUTARIC (A.). — Quelques remarques sur les équilibres de membrane. *Revue gén. des Sciences*, 1933, 44, 633.
170. DUCLAUX (J.). — *Revue générale des colloïdes*, 1930, 8, 251.
171. KOPACZEWSKI (W.). — *Traité de Biocolloïdologie*. *Gautier-Villars éd. Paris*, 1934, tome IV, fasc. 3, p. 323.
172. GELLHORN (E.) et REGNIER (J.). — La perméabilité en physiologie et en pathologie générale. 1 vol. *Masson et Cie éd., Paris*, 1936.
173. Extrait des procès-verbaux des séances de la Société de Chimie Biologique, séance du 4 janvier 1938. *Bull. Soc.*

Chim. Biol., 1938, 20, 140.

174. FALTA (W.) und RICHTER-QUITTNER (M.). — Über die Verteilung des Zuckers, der chloride und der Restickstoffkörper auf Plasma und Körperchen im strommenden Blut. *Biochem. Z.*, 1919, 100, 148.
175. HANKE (M.-E.) and DONOVAN (P.-B.). — The organic chlorides of tissues and possible relation to gastric hydrochloric acid formation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1927, 24, 580. Cité par PETERS (J.-P.) and VAN SLYKE (D.-D.) in *Quantitative clinical Chemistry*, tome I (Interpretations), p. 1019-1089, Londres, *Baillière and Co*, éd.
176. HAMBURGER (H.-J.) und VAN LIER (G.-A.). — Die Durchlässigkeit der roten Blutkörperchen für die Anionen von Natriumsalzen. *Arch. f. Physiol.*, 1902, 492.
177. DE BOER (S.). — The influence of the respiration on the exchange of SO_4 between corpuscles and plasma and its effect on the excretion of SO_4 . *J. of Physiol.*, 1917, 51, 211.
178. ROHONY (H.). — Über die Elektrolytpermeabilität der roten Blutkörperchen. *Kolloidchem. Beih.*, 1916, 8, 337.
179. WIECHMANN (E.). — Über die Durchlässigkeit der menschlichen roten Blutkörperchen für Anionen. *Pflügers Arch.*, 1921, 91, 245.
180. MICHAELIS (L.). — Contribution to theory of permeability of membranes for electrolytes. *J. gen. Physiol.*, 1925, 8, 33.
181. MICHAELIS (L.) and PERLZWEIG (W.-A.). — Studies on the permeability of membranes. I. Introduction and the diffusion of ions across the dried collodion membrane. *J. gen. Physiol.*, 1927, 10, 575.
182. MICHAELIS (L.), ELLSWORTH and WEECH (A.-A.). — Studies on the permeability of membranes. II. Determination of ionic transfer numbers in membranes from concentration chains. *J. gen. Physiol.*, 1927, 10, 671.
183. MICHAELIS (L.), WEECH (A.-A.) and YAMATORI. — Studies on the permeability of membranes. III Electric transfer experiments with the dried collodion membrane. *J. gen. Physiol.*, 1927, 10, 685.
184. MICHAELIS (L.) and WEECH (A.-A.). — Studies on the permeability of membranes. IV. Variation of transfer numbers with the dried collodion membrane produced by the electric current. *J. gen. Physiol.*, 1927, 11, 147.
185. MOND (R.). — Umkehr der Anionen permeabilität der roten Blutkörperchen in eine elektive Durchlässigkeit für Kationen. Ein Beitrag zur Analyse der Zellmembranen. *Pflügers Arch.*, 1927, 217, 48.

186. MULLER (E.). — Uber die Wirkung des Insulins auf den Blutzucker « in vitro ». *Biochem. Z.*, 1926, 175, 491.
187. VELICOGNA (A.). — Sulla permeabilità dei globuli rossi al glucosio sotto l'azione dell' insulina. *Arch. di Fisiol.*, 1927, 25, 339. Cité par GELLHORN (E.) et REGNIER (J.) in *La perméabilité en Physiologie et en Pathologie générale*, d'après RONAS: Berichten 43, 428.
-

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.	9
INTRODUCTION	11
CHAPITRE PREMIER. — <i>Influence des anticoagulants minéraux sur les éléments minéraux du sang et en particulier sur le rapport chloré globulo-plasmatique. Historique et état actuel du problème.</i>	17
1. Généralités.	17
2. Historique des travaux antérieurs	19
3. Etat actuel du problème	30
4. Perméabilité des hématies	32
CHAPITRE II. — <i>Conditions générales d'étude</i>	39
1. Justification du choix du chlore	40
2. Valeur et signification du rapport ClG/ClP	46
3. Vue d'ensemble du protocole expérimental	50
4. Remarques générales concernant les techniques utilisées.	52
5. Application de la méthode cryoscopique à l'étude des phénomènes produits par les anticoagulants	65
6. Choix des électrolytes.	71
CHAPITRE III. — <i>Etude des témoins</i>	75
CHAPITRE IV. — <i>Etude des principaux anticoagulants. Résultats expérimentaux.</i>	83
1. Généralités.	83
2. Oxalate de sodium	86
3. Oxalate de potassium	93
4. Fluorure de sodium	96
5. Fluorure de potassium	100
6. Citrate trisodique et liquoïde	104
7. Influence de l'état physique de l'anticoagulant	110
8. Influence de l'acidité du milieu et de l'anticoagulant.	112
9. Influence de la nature de l'anticoagulant	117

CHAPITRE V. — <i>Effets généraux des anticoagulants</i>	121
1. Action diluante des anticoagulants	121
2. Effet des anticoagulants sur la répartition globulo- plasmatique des éléments minéraux du sang	127
CHAPITRE VI. — <i>Etude de quelques électrolytes</i>	131
1. Généralités.	131
2. Etude du chlorure de sodium	133
3. Etude de quelques électrolytes.	140
CHAPITRE VII. — <i>Interprétation générale des résultats</i>	143
1. Osmose et perméabilité	143
2. Effets d'électrolytes osmotiquement équivalents ...	151
3. Oxalates de sodium et de potassium	153
4. Fluorures de sodium et de potassium	157
5. Citrate trisodique et liquoïde	160
6. Electrolytes divers	163
7. Explication d'ensemble des faits	169
CHAPITRE VIII. — <i>Conséquence de nos expériences</i>	173
1. Conséquences théoriques	173
— 2. Conséquences pratiques.	179
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	183
BIBLIOGRAPHIE.	189

S E R M E N T

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

En ma qualité de Censeur de tour
j'ai lu la Thèse ayant pour titre :

*Anticoagulants et répartition
globulo - plasmatique des élé-
ments minéraux du sang.*

par M. Christian BENEZECH.

Je pense que la Faculté peut en
permettre l'impression :

Montpellier, le 13 mai 1943.

Le Professeur,
CRISTOL.

Vu:

Montpellier, le 17 mai 1943.

Le Doyen,
GIRAUD.

Vu et permis d'imprimer:

Montpellier, le 18 mai 1943

Le Recteur,
SARRAILH.

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises
dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées
comme propres à leur auteur et qu'elle n'entend leur donner ni approba-
tion, ni improbation.

